



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO ULTRASSONOGRAFICO DO CORPO LÚTEO E DA SUA  
RELAÇÃO COM A GESTAÇÃO E MORTALIDADE EMBRIO-FETAL EM  
VACAS FRÍSIAS HOLSTEIN

CARLOTA LUÍSA DUARTE SILVA DA CUNHA REIS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutor George Thomas Stiwell

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

ORIENTADOR

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

CO-ORIENTADOR

Dr. José Inácio Oliveira Alface

2018

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO ULTRASSONOGRAFICO DO CORPO LÚTEO E DA SUA  
RELAÇÃO COM A GESTAÇÃO E MORTALIDADE EMBRIO-FETAL EM  
VACAS FRÍSIAS HOLSTEIN

CARLOTA LUÍSA DUARTE SILVA DA CUNHA REIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutor George Thomas Stiwell

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

ORIENTADOR

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

CO-ORIENTADOR

Dr. José Inácio Oliveira Alface

2018

LISBOA

---



## **Agradecimentos**

Aos meus pais, a quem devo tudo o que sou, que me ensinaram a não desistir e que são exemplo vivo de que a persistência e o trabalho dão frutos.

Ao Professor Doutor João Nestor das Chagas e Silva, por todos os ensinamentos que me transmitiu, apoio, dedicação e amizade, não só durante a realização da dissertação, mas durante o curso.

Ao Dr. José Alface por me ter aceitado como sua estagiária, pela sua disponibilidade, ensinamentos e boa disposição durante o estágio e preciosa ajuda durante a recolha de dados.

À Fonte Leite Exploração Agrícola S.A. e a todos os seus colaboradores, que tão bem me receberam, que me fizeram sentir em casa e por todos os bons momentos passados. Pela disponibilização do ecógrafo e por terem facilitado e ajudado na execução do estudo.

Ao Professor Doutor Telmo Nunes, por me ter ajudado na realização da análise estatística dos dados e por toda a sua disponibilidade.

Aos meus colegas de estágio, Inês, Catarina e João, pela ajuda na recolha de dados, pela partilha de conhecimentos e todos os momentos de alegria e boa disposição vividos.

Aos javalis, Cilinha, João, Augusto, Carmitos, Daniela, Zuca e Manuel, por todos estes anos de curso, onde houve tempo para muito estudo e diversão e, principalmente, de muita amizade.

À Joana, à Mafalda e à Sofia por toda amizade, apoio e presença constante na minha vida.

À Assunção, à Luísa, ao Manuel, ao Duarte e à Francisca que contribuíram com companhia, apoio e amizade para realização desta dissertação.

## **Estudo ultrassonográfico do corpo lúteo e da sua relação com a gestação e mortalidade embrio-fetal em vacas Frísias Holstein**

### **Resumo**

Vários estudos verificaram que o tamanho folicular influencia as dimensões do corpo lúteo (CL) subsequente. Por sua vez, quanto maior for a quantidade de tecido lúteo, maior a sua capacidade de síntese de progesterona ( $P_4$ ). Esta hormona é responsável pela preparação do ambiente uterino para o desenvolvimento embrionário e para a manutenção da gestação. Assim, no presente ensaio experimental foi estudada a possível relação entre a área do CL e a sua evolução, logo após a IA, durante os períodos mais críticos da manutenção do CL, com a gestação e com a mortalidade embrio-fetal. Foi igualmente estudada uma possível relação entre a área do folículo pré-ovulatório (FPO), a área do CL subsequente e a ocorrência de gestação. O objetivo final era a deteção, através da mensuração ecográfica do CL, de gestações de risco. Fizeram parte do estudo 69 vacas da raça Frísia Holstein, em lactação, que responderam ao protocolo de *Ovsynch* para inseminação a tempo fixo (IATF). Foram realizados exames ultrassonográficos aos FPO (dia anterior à IATF) e aos CL subsequentes (dias 7, 14, 19, 35, 42 e 63 após IATF). O diagnóstico de gestação (DG) foi efetuado nos dias 35, 42 e 63 após a IA. Procedeu-se ao estudo da relação da área do FPO, área do CL e gestação considerando a paridade e o número de ovulações da fêmea.

Nas vacas com ovulação simples, verificou-se que a área do CL no dia 14 foi maior em vacas gestantes que em não gestantes ao DG no dia 35 após IATF ( $p = 0,009$ ), mas o mesmo não se confirmou ao dia 19. Observou-se, também, nas vacas com ovulação dupla bilateral, uma maior área do FPO em fêmeas gestantes que em vazias no dia 35 após IATF ( $p = 0,043$ ). Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos em relação ao DG nos dias 42 e 63.

No presente estudo não foi possível chegar a qualquer conclusão definitiva sobre o recurso à avaliação ultrassonográfica da área do CL como forma de previsão da ocorrência de mortalidade embrio-fetal por subfunção lútea, muito possivelmente em virtude do número reduzido da amostra estudada.

**Palavras-chave:** Corpo lúteo; folículo pré-ovulatório; gestação; mortalidade embrio-fetal; ultrassonografia; vacas leiteiras.

## **Corpus luteum ultrasonographic study and its relationship with gestation and embryo-fetal mortality in Holstein Frisian cows**

### **Abstract**

Several studies have stated that the follicular size influences the subsequent corpus luteum (CL) dimension. At the same time, a greater amount of luteal tissue has the ability of synthesizing more progesterone ( $P_4$ ). This hormone is responsible for the preparation of the uterine environment for embryonic development and for pregnancy maintenance. Therefore, in the present experimental trial CL area and its evolution after artificial insemination (AI) was correlated with the occurrence of pregnancy and embryo-fetal mortality, including the most critical periods of gestation maintenance. It was also investigated a possible relationship between the pre-ovulatory follicle area (POF), the subsequent CL area, and the establishment of gestation. The final purpose of this experimental study was the tracking of early detection of risk pregnancies by measuring the CL dimensions using an ultrasound machine. The study included sixty-nine lactating Holstein Frisian cows that responded to the *Ovsynch* fixed-time artificial insemination protocol (FTAI). Ultrasound examinations were performed for the evaluation of POF (on the former day to FTAI) and subsequent CL dimensions (7, 14, 19, 35, 42 and 63 days after FTAI). The pregnancy diagnosis (PD) was performed on day 35, 42 and 63 after AI. The relationship between the POF area, CL area and pregnancy considering parity and ovulation number was studied.

Regarding cows with single ovulation, it was observed, in the PD on day 35 after FTAI, that the CL area on day 14 was significantly higher on pregnant cows than on non-pregnant cows ( $p = 0.009$ ). However, this difference was not observed on day 19. Regarding cows with double bilateral ovulations it was also observed that the POF area was higher in pregnant than non-pregnant females on day 35 after FTAI ( $p = 0.043$ ). No significant statistic results were found when observing the PD on days 42 and 63.

In the present experimental trial it was not possible to draw definitive conclusions about the use of ultrasound measurements of CL area as a way to predict the occurrence of embryo-mortality by luteal sub-function, most probably because of the reduced sample size.

**Key words:** Corpus luteum; pre-ovulatory follicle; pregnancy; embryo-fetal mortality; ultrasound; dairy cows.

## Índice

Lista de Figuras .....	vii
Lista de Tabelas .....	vii
Lista de Gráficos.....	viii
Lista de abreviaturas e siglas .....	ix
Relatório de estágio .....	xi
1. Recolha de dados para o estudo .....	xi
2. Atividades diárias na Fonte Leite .....	xi
3. Clínica e cirurgia .....	xiii
4. Outras atividades.....	xiv
PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	1
1. FISIOLOGIA DO CORPO LÚTEO .....	1
1.1 Angiogénese .....	2
1.1.1 Folículo pré-ovulatório .....	3
1.1.2 Formação do corpo lúteo .....	4
1.1.2.1 Família VEGF.....	4
1.1.2.2 Família FGF.....	5
1.1.2.3 Família IGF .....	5
1.1.2.4 Família das Angiopoetinas.....	6
1.2 Luteinização .....	7
1.2.1 Produção de progesterona.....	9
1.3 Luteólise.....	11
1.3.1 Produção de PGF <sub>2α</sub> pelo endométrio .....	12
1.3.2 Produção de PGF <sub>2α</sub> pelo corpo lúteo.....	13
1.3.3 Luteólise funcional.....	13
1.3.4 Luteólise estrutural .....	16
1.3.5 Eventos imunomediados .....	18
2. CORPO LÚTEO E A GESTAÇÃO .....	19
2.1 Reconhecimento materno da gestação .....	20
2.1.1 Ações da progesterona no endométrio e no alongamento do concepto .....	20
2.1.2 Ação do concepto no endométrio e na manutenção do corpo lúteo .....	21
2.1.2.1 IFNT .....	21
2.1.2.1.1 Genes estimulados pelo INF clássicos e não clássicos .....	22
2.1.2.1.2 IFNT e COX2.....	23
2.1.2.1.3 IFNT e células do sistema imunitário .....	24
2.1.2.2 Prostaglandinas .....	24



2.1.2.2.1	PGE <sub>2</sub> como agente luteotrópico durante o reconhecimento materno da gestação.....	24
2.1.2.2.2	Síntese e vias de sinalização da PGE <sub>2</sub> .....	25
2.1.2.2.3	PGE <sub>2</sub> na manutenção lútea.....	26
2.1.3	Alterações vasculares.....	26
2.2	O corpo lúteo entre os dias 30 e 60 da gestação.....	27
2.3	Indução do parto por luteólise entre os dias 270 a 290 de gestação.....	28
3.	MORTALIDADE EMBRIO-FETAL POR SUBFUNÇÃO LÚTEA.....	29
3.1	Corpo lúteo e mortalidade embrionária precoce .....	30
3.1.1	Persistência folicular .....	31
3.1.2	Duração do pró-estro e função lútea subsequente .....	32
3.1.3	Progesterona e ambiente tubário e uterino .....	33
3.1.4	Reconhecimento materno da gestação (manutenção do corpo lúteo) .....	34
3.2	Corpo lúteo e mortalidade embrionária tardia e fetal precoce .....	34
3.2.1	Maturidade folicular .....	35
3.2.2	Concentração de P <sub>4</sub> e mortalidade embrionária tardia/fetal precoce .....	35
3.2.3	Placentação.....	36
3.2.3.1	Placentação e o segundo estímulo para a manutenção da gestação .....	37
3.3	Regressão lútea ou morte do embrião como causa de perda da gestação? .....	38
3.4	Subfunção lútea ou maior metabolização de progesterona? .....	38
	PARTE II – ENSAIO EXPERIMENTAL.....	40
1.	Introdução.....	40
2.	Materiais e métodos.....	41
2.1	Animais em estudo.....	41
2.2	Desenho experimental.....	42
2.3	Recolha de dados.....	43
2.4	Análise estatística.....	43
3.	Resultados.....	44
3.1	Vacas primíparas <i>versus</i> múltiparas .....	45
3.2	Vacas com ovulação simples <i>versus</i> ovulação dupla.....	46
3.3	Grupo ovulação simples .....	47
3.4	Grupo ovulação dupla.....	50
4.	Discussão .....	52
4.1	Área do FPO e CL de primíparas <i>versus</i> múltiparas .....	54
4.2	Área do FPO e CL de ovulação simples <i>versus</i> ovulação dupla .....	54
4.3	Relação da área do FPO com a do CL subsequente e com a gestação .....	55

4.4	Influência da área do CL na obtenção da gestação .....	56
4.5	Limitações do estudo .....	59
5.	Conclusão .....	59
	Bibliografia .....	61
	Anexo 1 .....	76
	Anexo 2 .....	78
	Anexo 3 .....	80

## Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema do protocolo de sincronização de estro .....	xii
Figura 2 – Folículo pré-ovulatório (adaptado de Bruno <i>et al.</i> , 2009).....	1
Figura 3 – Fases da vascularização lútea e sua regulação por LH (adaptado de Stocco, Telleria & Gibori, 2007).....	3
Figura 4 – Expressão do rácio ANPT2/1 (barras pretas) e VEGF (barras brancas) durante a formação, manutenção e luteólise do CL (adaptado de Schams & Berisha, 2005) .....	6
Figura 5 – Via da biossíntese da progesterona na célula lútea (adaptado de Niswender <i>et al.</i> , 2000).....	9
Figura 6 – Mecanismos de regulação intracelulares das LLC e SLC da função lútea do CL maturo (adaptado de Niswender <i>et al.</i> , 2007).....	11
Figura 7 – Síntese de prostaglandinas no endométrio (adaptado de Goff, 2004) .....	12
Figura 8 – Mecanismos de regulação intracelular das LLC e SLC da função lútea durante a luteólise funcional (adaptado de Niswender <i>et al.</i> , 2007) .....	15
Figura 9 - Mecanismos de regulação intracelular das LLC e SLC da função lútea durante a luteólise estrutural (adaptado de Niswender <i>et al.</i> , 2007).....	16
Figura 10 – Representação esquemática dos possíveis fatores envolvidos na luteólise (Berisha & Schams, 2005) .....	18
Figura 11 – Diagrama representativo da concentração de progesterona durante a gestação dando ênfase aos períodos decisivos de manutenção do CL (adaptado de Wiltbank <i>et al.</i> , 2016b) .....	19
Figura 12 – Modelos fisiológicos propostos para os mecanismos envolvidos na manutenção ou regressão do CL ipsilateral e contralateral durante os períodos cruciais da gestação, entre os dias 19-25 e dias 30-60 (adaptado de Baez <i>et al.</i> , 2017).....	28
Figura 13 – Desenvolvimento embrio-fetal (adaptado de Lonergan, 2015).....	30
Figura 14 – Imagem ecográfica de um folículo e corpo lúteo .....	80
Figura 15 – Imagem ecográfica do corpo lúteo cavitário .....	80
Figura 16 – Imagem ecográfica do corpo lúteo .....	80
Figura 17 – Imagem ecográfica de um embrião com 35 dias .....	80
Figura 18 – Imagem ecográfica de um feto com 42 dias .....	80
Figura 19 – Imagem ecográfica de um feto com 63 dias .....	80

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Casos clínicos, cirurgias e atividades desenvolvidas durante o estágio .....	xiv
Tabela 2 – Vacas excluídas do estudo .....	41
Tabela 3 - Desenho experimental e eventos associados .....	42
Tabela 4 - Distribuição do sémen utilizado nas IA nos animais do ensaio .....	44
Tabela 5 - Distribuição das vacas quanto ao número de ovulações e paridade.....	45
Tabela 6 - Distribuição da amostra de FPO quanto à paridade e tipo de ovulação .....	45

Tabela 7 - Comparação da área do CL quanto à paridade das variáveis sem distribuição normal.....	46
Tabela 8 - Comparação da área do CL quanto à paridade, relativamente às variáveis com distribuição normal .....	46
Tabela 9 - Comparação da área do CL quanto ao tipo de ovulação, relativamente às variáveis sem distribuição normal.....	46
Tabela 10 - Comparação da área do CL quanto ao tipo de ovulação, relativamente às variáveis com distribuição normal.....	47
Tabela 11 - Taxas de gestação e de mortalidade no Grupo de ovulação simples .....	47
Tabela 12 - Taxas de gestação e de mortalidade em relação à paridade no Grupo de ovulação simples .....	47
Tabela 13 - Teste de correlação entre a área do FPO e a área do CL, em vacas não gestantes (ovsimples).....	48
Tabela 14 - Teste de correlação entre a área do FPO e a área do CL, em vacas gestantes (ovsimples) .....	48
Tabela 15 - Comparação da área do CL quanto ao diagnóstico de gestação no dia 35 (ovsimples) .....	48
Tabela 16 - Comparação da área do CL quanto ao diagnóstico de gestação no dia 42 (ovsimples) .....	49
Tabela 17 - Comparação da diferença das áreas do CL entre medições consecutivas quanto ao DG no dia 35 (ovsimples) .....	49
Tabela 18 - Comparação da diferença das áreas de CL entre medições consecutivas quanto ao DG no dia 42.....	50
Tabela 19 - Teste de correlação entre a área do FPO e a área do CL, em vacas não gestantes (ovdupla).....	51
Tabela 20 – Teste de correlação entre a área do FPO e a área do CL, em vacas gestantes (ovdupla) .....	51
Tabela 21 - Comparação da área do CL quanto ao diagnóstico de gestação do dia 35 (ovdupla) .....	51
Tabela 22 - Comparação da diferença das áreas de CL entre medições consecutivas quanto ao DG no dia 35 (ovdupla) .....	52
Tabela 23 - Comparação entre a área do CL ipsilateral e o CL contralateral em fêmeas gestantes no dia 35 (ovdupla) .....	52
Tabela 24 - Tabela de registo de dados .....	76
Tabela 25 (continuação).....	77
Tabela 26 – Tabela após o tratamento de dados.....	78
Tabela 27 (continuação).....	79

## Lista de Gráficos

Gráfico 1 - <i>Boxplot</i> da área do CL aos 14 dias consoante o DG aos 35 dias (ovsimples) .....	49
Gráfico 2 - <i>Bloxplot</i> da área do FPO ao DG aos 35 dias (ovdupla).....	50

## Lista de abreviaturas e siglas

AA	Ácido araquidónico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Ang II	Angiotensina II
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ANPT	Angiopoetina
ATP	Adenosina trifosfato
CE	Células endoteliais
CL	Corpo lúteo
COX	Cicloxygenase
DAE	Deslocamento do abomaso à esquerda
DAG	1,2 – diacilglicerol
DG	Diagnóstico de gestação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
EP	Recetor de prostaglandina E <sub>2</sub>
ER	Recetor do estradiol
ET-1	Endotelina 1
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR	Recetor de FGF
FPO	Folículo pré-ovulatório
GH	Hormona de crescimento
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofinas
HDL	Lipoproteína de elevada densidade
HDL-BP	Proteína de ligação da HDL
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial a tempo fixo
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFBP	Proteína de ligação do IGF
IGFR	Recetor de IGF
IL	Interleucina
INFY	Interferão gama
INFT	Interferão tau
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
IP3	1,4,5 – trifosfato de inositol
ISG	<i>Interferon stimulated-gene</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-R	Recetor de LDL

LH	Hormona luteinizante
LLC	Células lúteas grandes
MEC	Matriz extracelular
MET	Mortalidade embrionária tardia
MFP	Mortalidade fetal precoce
MMP	Metaloproteinases
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NO	Óxido nítrico
OT	Ocitocina
OTR	Recetor de ocitocina
P <sub>4</sub>	Progesterona
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PG	Prostaglandinas
PGDH	Prostaglandina 15 desidrogenase
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGES	Prostaglandina E sintetase
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
PGFS	Prostaglandina F sintetase
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA	Fosfolipase A
PLC	Fosfolipase C
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PR	Recetor de progesterona
P450 <sub>scc</sub>	<i>Cytochrome P450 side chain cleavage</i>
REL	Retículo endoplasmático liso
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SLC	Células lúteas pequenas
Spz	Espermatozóides
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral α
TSA	Teste de sensibilidade a antibióticos
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	Recetor de VEGF
3βHSD	3β-Hidroxiesteróide desidrogenase

## **Relatório de estágio**

O presente estágio curricular realizou-se na Fonte Leite – Exploração Agrícola e Pecuária S.A., na Azambuja, do dia 21 de Setembro de 2016 ao dia 24 de Fevereiro de 2017, com o horário de trabalho das 8h às 18h. Durante este período de tempo, foi feita a recolha de dados para o estudo, foram acompanhadas as atividades do médico-veterinário Dr. José Alface e, a participação em muitas das rotinas diárias da exploração. Como complemento ao estágio curricular, entre 15 de Junho e 17 de Julho de 2017, em S. Teotónio (Odemira), foi acompanhado o trabalho do Dr. Rui Silva, passando pelas áreas da sanidade, reprodução e clínica médica.

### **1. Recolha de dados para o estudo**

O estudo consistiu na avaliação ecográfica do corpo lúteo durante a gestação de vacas primíparas e múltíparas. Para tal, foi efetuada a medição ecográfica do folículo pré-ovulatório um dia antes da inseminação a tempo fixo, o que acontecia por norma à quinta-feira. Às quartas e sextas-feiras realizava-se a avaliação ecográfica do corpo lúteo, correspondente aos dias 7, 14, 19-21, 35, 42 e 60 da gestação, exceto nas vacas que entravam em cio ou com o diagnóstico gestacional negativo. A recolha de dados ocorria durante a manhã ou durante a tarde, consoante o número de animais e a logística das atividades do dia. No total, foram seguidos 107 animais.

### **2. Atividades diárias na Fonte Leite**

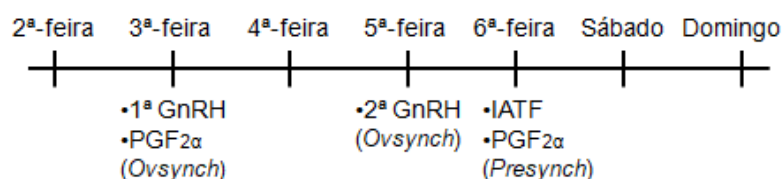
O controlo reprodutivo era efetuado todas as terças-feiras durante a manhã. Realizava-se o primeiro (aos 37 dias,  $\pm 3$  dias) e o segundo (ao 3º mês) diagnóstico de gestação (DG), por ecografia e palpação transrectal, respetivamente. Se o resultado fosse negativo, no caso do primeiro diagnóstico, era administrada a prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) para a re-sincronização do cio, tendo sido a primeira injeção de GnRH do protocolo de sincronização *Ovsynch* administrada uma semana antes do dia previsto para o primeiro diagnóstico (Figura 1). Estando a vaca vazia ao 2º diagnóstico (mortalidade embrio-fetal) era iniciado o *Ovsynch*. Nas novilhas com mais de 14 meses, sem inseminação ou vazias ao diagnóstico de gestação, o protocolo passava pela aplicação de um dispositivo intravaginal de libertação de progesterona, PRID® Delta (Ceva Saúde Animal – Produtos Farmacêuticos e Imunológicos, Lda., Portugal), durante 7 dias, com administração de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  no dia anterior à remoção do PRID.

A secagem das vacas era realizada durante a manhã de quinta-feira. Após a última ordenha era feita a limpeza de cada teto com um toalhete de álcool e, posteriormente, a aplicação do antibiótico sob forma de pomada intramamária. Quando faltavam mais de 36 dias para o parto, era aplicado o Virbactan® (Virbac, França), cujo princípio ativo é a cefquinoma. Se o período de secagem fosse inferior a 36 dias era aplicado o Fatroximin® (Fatro, S.p.A., Itália), sendo a rifaximina o princípio ativo. Por último, era aplicado o selante Noroseal® (Norbrook

Laboratories Limited, Irlanda do Norte). Após cerca de dois meses de estágio, o protocolo de secagem foi alterado passando a ser realizada uma secagem seletiva. Neste caso, era avaliado o contraste leiteiro de cada vaca dos últimos três meses. Se não houvesse registo de mamites e se o número de células somáticas fosse inferior a 200.000 células/mL, não eram aplicados antibióticos, ou seja, após a limpeza com toalhete de álcool de cada teto era apenas administrado o selante. Após a secagem, as vacas eram vacinadas com Rotavec Corona® (MSD Animal Health, Lda., Portugal), cuja imunização estimula a produção de anticorpos contra *Coronavirus*, *Rotavirus* e *E. Coli* no colostro e, era efetuada uma avaliação da condição corporal na escala de 1-5. No final da manhã, era administrado um dispositivo intrarruminal de libertação contínua de monensina, o Kexxtone® (Elanco Animal Health, Reino Unido), às vacas gestantes com maior risco de desenvolver posteriormente cetose e que se encontravam a 3-4 semanas da data prevista do parto. Da parte da tarde era administrada a segunda injeção de GnRH do protocolo *Ovsynch* (Figura 1).

Às sextas-feiras, administrava-se a PGF<sub>2α</sub> do protocolo do *Presynch* (Figura 1) e eram realizadas as inseminações artificiais a tempo fixo (IATF).

Figura 1 – Esquema do protocolo de sincronização de estro



Todos os dias, no final da primeira ordenha do dia, efetuava-se o controlo das mastites. Eram recolhidas amostras de leite das vacas recém-paridas e de vacas com novo diagnóstico de mastite, e mais tarde enviadas para análise para deteção de agentes de mastites contagiosas, por PCR ou cultura microbiológica geral, associada, por vezes, ao teste de sensibilidade a antibióticos (TSA). Após a recolha do colostro, este era avaliado em termos de qualidade através da utilização do refratómetro digital com índice *Brix*. Seguidamente realizava-se o tratamento das mastites e o de vacas com outras situações clínicas. Em alguns dias da semana, efetuava-se a contagem de células somáticas de uma amostra retirada de cada tanque de leite com o recurso ao aparelho DeLaval DCC®. Por vezes, era utilizado o *kit* Delvotest® SP-NT, nomeadamente quando as vacas pariam precocemente após o tratamento de secagem, de forma a garantir a ausência de antibióticos no leite.

A avaliação das vacas no pós-parto compreendia dois intervalos distintos, entre os dias 4-10 e dias 11-17, associada a uma avaliação visual aquando da mudança do parque do colostro para o parque de produção, nomeadamente, para deteção de retenção placentária e nova avaliação da condição corporal, como complemento da realizada na altura da secagem. No

primeiro intervalo, avaliava-se a temperatura retal e se fosse superior a 39,5 °C, com auxílio do *Metricheck* ou por palpação vaginal, observavam-se as características do corrimento para determinar a presença ou não de metrite. No segundo, era avaliada a involução do útero por palpação rectal e, mais uma vez, as características do corrimento. Sempre que necessário recorria-se à utilização do ecógrafo. No caso de deteção de metrite ou endometrite era administrado o tratamento adequado, que incluía, para além da PGF<sub>2α</sub> aplicadas no *Presynch*, a administração de Ceftiocyl® (ceftiofur; Vetoquinol, Lda., Portugal), Tolfedine® (ácido tolfenâmico; Vetoquinol, Portugal) e, eventualmente, Metricure® (MSD Animal Health, Lda., Portugal), suspensão intrauterina (cefapirina).

### 3. Clínica e cirurgia

A maioria das vacas doentes eram detetadas por avaliação do seu registo produtivo, ou seja, as vacas que demonstravam quebras na produção de leite eram separadas e posteriormente examinadas. Observaram-se vários casos clínicos, tais como, deslocamento de abomaso, cetose, hipocalcémia, pneumonia, cistite, diarreia, indigestão vagal e jejunité hemorrágica. Ocorreram casos pontuais de distócia com recurso à tração mecânica (Tabela 1).

Nos vitelos foram observados casos de criptosporidiose, timpanismo ruminal, pneumonia, onfalite, otite, queratoconjuntivite e um caso de estomatite fúngica associada a diarreia viral bovina (BVD). Realizaram-se lavagens transtraqueais a dois vitelos com o intuito de determinar os agentes causadores de pneumonia e para efetuar um TSA. Detetou-se a presença de *Mycoplasma* e *Pasteurella multocida*. Foram também recolhidas amostras de sangue da veia jugular para determinar a qualidade do encolostramento, através da avaliação das proteínas totais.

Foram realizadas abomasopexias pelo flanco esquerdo, omentopexias pelo flanco direito e uma cesariana. Num vitelo foi realizada uma herniorrafia umbilical (Tabela 1).

Determinados casos levaram à realização de eutanásia, particularmente, em casos de fraturas nos membros pélvicos e de animais em estado patológico crónico. Em algumas destas situações e em casos de morte súbita, foram efetuadas necrópsias em que se observaram casos de abscesso hepático, pneumonia por *Arcanobacterium pyogenes*, pneumonia associada a um enfisema subcutâneo generalizado, provavelmente provocado por vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) e reticuloperitonite traumática.

Durante o estágio, o efetivo foi vacinado com Bravoxin®10 (MSD Animal Health, Lda., Portugal) para imunização contra clostridioses e Hiprabovis-4® (Laboratorios Hipra, S.A., Espanha) que confere proteção contra o vírus BVD, vírus da rinotraqueite infecciosa bovina (IBR), parainfluenza-3 (PI3) e BRSV.



Tabela 1 – Casos clínicos, cirurgias e atividades desenvolvidas durante o estágio

<b>Vacas</b>		<b>Vitelos</b>			
DAE	18	Mastite clínica	151	Onfalite	8
Laparotomia exploratória	2	Metrite	58	Diarreia	11
Cesariana	1	Endometrite	5	Cólica	5
Distócia	6	Retenção placentária	27	Timpanismo	1
Acidose	3	Úlcera podal	13	Acidose	1
Cetose	2	Fleimão	11	Pneumonia	68
Hipocalcemia	10	Dermatite interdigital	27	Otite	1
Indigestão ruminal	5	Laminite	9	Herniorrafia	1
Jejunite hemorrágica	1	Fratura óssea	2	-	
Pneumonia	1	Palpação rectal	500	-	
Cistite	1	Ecografia rectal	500	-	

#### 4. Outras atividades

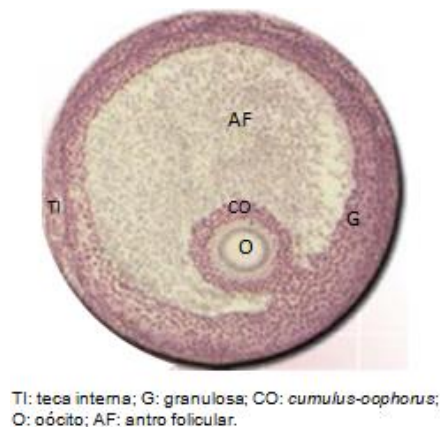
As atividades dos engenheiros zootécnicos foram também acompanhadas, tais como, inseminações artificiais, transporte de animais, identificação de animais, entre outras. Muitas vezes foram realizadas atividades de manejo no vitleiro, tais como, administração de leite e colostro, descorna, identificação de animais, desinfecções umbilicais e movimentações de animais para outros parques.

## PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. FISIOLOGIA DO CORPO LÚTEO

O ciclo ovárico é o centro da função reprodutiva, revelando padrões repetidos de proliferação, diferenciação e transformação celular que envolvem o desenvolvimento folicular, a ovulação, a formação e regressão do corpo lúteo (CL) (Berisha & Schams, 2005). A parede folicular é constituída por duas camadas e, conseqüentemente, por dois tipos celulares distintos, as células da teca e as células da granulosa (Figura 2). Após a ovulação, estas sofrem vascularização e luteinização, originando um corpo lúteo (Singh, Pierson & Adams, 1997). Hoje em dia, é evidente a importância que a angiogénese e o estabelecimento de uma circulação sanguínea funcional têm sobre a foliculogénese, desenvolvimento do folículo dominante e formação do CL. Sendo assim, é claro o papel fulcral que determinados fatores de crescimento vão desempenhar nesses eventos, como por exemplo *insulin-like growth factor* (IGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e o *fibroblast growth factor* (FGF) (Berisha & Schams, 2005).

Figura 2 – Folículo pré-ovulatório (adaptado de Bruno *et al.*, 2009)



O corpo lúteo é uma glândula esteroidogénica transitória. Sofre alterações funcionais marcadas durante o seu desenvolvimento, vida funcional e regressão (Singh, Pierson & Adams, 1997). A sua principal função é a produção de progesterona ( $P_4$ ), que é essencial na preparação do ambiente uterino para o desenvolvimento embrionário e na manutenção da gestação (Fields & Fields, 1996; Schams & Berisha, 2004; Siqueira *et al.*, 2009). Também regula a duração de cada ciclo éstrico, através da ação da progesterona sobre a capacidade de libertação de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) pelo endométrio, que resulta em perda da capacidade esteroidogénica, morte celular, involução e reabsorção do tecido lúteo (luteólise) (Milvae, 2000; Berisha & Schams, 2005; Siqueira *et al.*, 2009).

Para além das ações exercidas pela hormona luteinizante (LH) e hormona de crescimento (GH), que são os principais estímulos para o início da formação e desenvolvimento do CL,

hoje conhecemos também a importante ação de reguladores locais (fatores de crescimento, péptidos, esteróides e prostaglandinas) como modeladores da função lútea (Berisha & Schams, 2005).

Existem dois grupos de células no CL. No primeiro grupo, inserem-se as células esteroidogénicas, as células lúteas grandes (LLC) e células lúteas pequenas (SLC). O segundo grupo caracteriza-se por células não-esteroidogénicas, tais como, células endoteliais, pericitos, fibroblastos, células musculares lisas e do sistema imunitário. Todas elas desempenham uma função ativa na formação, manutenção e regressão do CL (Niswender *et al.*, 2000; Vonnahme *et al.*, 2006).

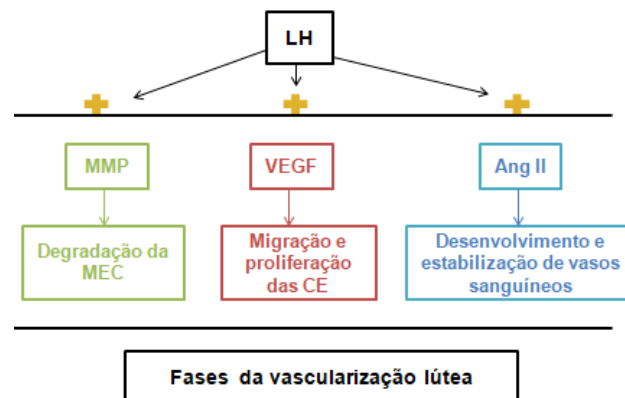
### **1.1 Angiogénese**

Durante a remodelação cíclica que ocorre durante o crescimento folicular, ovulação, formação e regressão do CL, estão envolvidas alterações hemodinâmicas que se revelam essenciais para o desenvolvimento e normal funcionamento do CL (Singh, Pierson & Reynolds, 1997; Acosta *et al.*, 2002; Acosta *et al.*, 2003; Acosta & Miyamoto, 2004; Berisha & Schams, 2005).

A angiogénese consiste na formação de novos vasos sanguíneos envolvendo a migração e proliferação de células endoteliais de vasos sanguíneos pré-existentes em direção a um estímulo angiogénico (Klagsbrun & D'Amore, 1991; Redmer & Reynolds, 1996; Schams & Berisha, 2004). É um processo complexo que implica um equilíbrio delicado entre promotores e inibidores, sendo que os fatores com maior relevância são VEGF, FGF-1 e FGF-2, IGF-1 e IGF-2 e angiopoetinas (ANPT-1 e ANPT-2). Os fatores de crescimento transformadores (TGF), os péptidos vasoativos, como a angiotensina II (Ang II), endotelina-1 (ET-1) e peptídeo natriurético atrial (ANP) e, por fim, as proteínas da matriz extracelular, são também importantes indutores da angiogénese (Acosta & Miyamoto, 2004; Schams & Berisha, 2004).

Os fatores de crescimento são ativados, estimulando as células endoteliais em estado de quiescência a degradar proteoliticamente a membrana basal do capilar sanguíneo de origem (Figura 3). Por isso, a migração em direção ao estímulo angiogénico é permitida. As células endoteliais irão organizar-se e proliferar originando um novo vaso sanguíneo (Schams & Berisha, 2004, 2005).

Figura 3 – Fases da vascularização lútea e sua regulação por LH (adaptado de Stocco, Telleria & Gibori, 2007)



### 1.1.1 Folículo pré-ovulatório

Segundo estudo realizado por Acosta *et al.* (2003), antes do pico de LH foi identificada uma pequena área de fluxo sanguíneo na base do folículo pré-ovulatório (FPO). Este pequeno aumento de vascularização folicular está relacionado com o aumento gradual dos níveis plasmáticos de estradiol, que provoca uma dilatação rápida dos vasos sanguíneos por ativação do óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), que atua diretamente na regulação do fluxo sanguíneo dos ovários. São os recetores de estradiol-alfa ( $ER\alpha$ ) que modulam os efeitos a curto-prazo do estradiol (Chen *et al.*, 1998 citados por Acosta *et al.*, 2003). Desta forma, há um aumento do fluxo sanguíneo na parede folicular permitindo o fornecimento de gonadotrofinas, nutrientes, substratos hormonais e outros componentes sanguíneos necessários à ovulação (Acosta *et al.*, 2003; Acosta & Miyamoto, 2004).

O pico de LH induz alterações na matriz extracelular do ovário e redistribui o fluxo sanguíneo folicular várias horas antes da ovulação, com uma maior vascularização na base e menor no ápex folicular (Acosta *et al.*, 2003). Foi observado *in vitro* que folículos maduros de bovinos, na presença de LH, libertavam ET-1 produzida por células da teca, mas não tinham qualquer influência sobre a libertação de Ang II e ANP (Acosta *et al.*, 1998; Acosta & Miyamoto, 2004). Assim, através de estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, concluiu-se que, provavelmente, estes péptidos vasoativos interagiam entre eles através de reações em cascata. A ET-1 estimula o ANP, que por sua vez estimula a Ang II que, por sua vez, quando presente no fluido extracelular, inibe a libertação de ANP (Acosta & Miyamoto, 2004). Desta forma, verificou-se que as células endoteliais e foliculares esteroideogénicas comunicavam de forma parácrina e modulavam as alterações locais da corrente sanguínea no folículo ovulatório. Os péptidos vasoativos assumem um papel de mediação durante a estimulação do FPO pela LH, pois estão envolvidos nos processos de libertação de prostaglandinas e esteróides durante a ovulação e desenvolvimento inicial do CL (Acosta *et al.*, 1998; Acosta *et al.*, 2003; Acosta & Miyamoto, 2004).

A degradação das camadas de colagénio da parede folicular é acompanhada por uma dilatação e aumento da permeabilidade vascular, que permite a rutura folicular (Murdoch *et al.*, 1986; Acosta & Miyamoto, 2004). Durante a ovulação, ocorre o colapso do folículo e perda da membrana basal. Assim, o bloqueio que impedia a vascularização da granulosa é perdido, permitindo a migração de componentes da matriz extracelular e a angiogénese a partir de capilares existentes na teca interna (Acosta *et al.*, 2003; Galvão, Ferreira-Dias & Skarzynski, 2013). O espaço vazio gerado pela ovulação vai ser preenchido por sangue, passando a ser denominado por corpo hemorrágico, que irá desenvolver-se e originar um CL maduro (Amaya, 2010).

### **1.1.2 Formação do corpo lúteo**

O desenvolvimento do CL caracteriza-se por uma intensa vascularização e, em simultâneo, por mitoses repetidas de células esteroidogénicas (Reynolds *et al.*, 2000; Acosta & Miyamoto, 2004). O que significa que a maioria das células parenquimatosas do CL maduro encontram-se em contacto com um ou mais capilares sanguíneos (Redmer & Reynolds, 1996; Reynolds *et al.*, 2000; Schams & Berisha, 2004), e que cerca de 85% das células em proliferação são endoteliais (Schams & Berisha, 2004). O pico do processo angiogénico no CL ocorre cerca de 2 a 3 dias após a ovulação (Redmer & Reynolds, 1996; Reynolds *et al.*, 2000; Acosta *et al.*, 2003). Os fatores que assumem maior importância neste fenómeno são o VEGF, FGF, IGF e as ANPT (Reynolds *et al.*, 2000; Acosta & Miyamoto, 2004; Schams & Berisha, 2004).

#### **1.1.2.1 Família VEGF**

O VEGF é um potente mitogénio produzido maioritariamente pelas células lúteas (Bruno *et al.*, 2009). Funciona como um quimiotático, pois estimula a migração de células endoteliais na sua direção (Schams & Berisha, 2004; Berisha & Schams, 2005; Bruno *et al.*, 2009). É importante na manutenção estrutural, no aumento da permeabilidade vascular e é um fator de sobrevivência das células endoteliais de microvasos (Roberts & Palade, 1995; Bruno *et al.*, 2009).

Todos os componentes deste sistema são encontrados ao longo de toda a fase lútea (Berisha *et al.*, 2000; Schams & Berisha, 2004). No início da fase lútea, observa-se um aumento da expressão de mRNA de VEGF e do seu recetor VEGFR-2 que diminuem no CL maduro e ainda mais após a sua regressão, o que é indicativo da sua ação na angiogénese (Berisha *et al.*, 2000; Berisha & Schams, 2005). O VEGFR-2 é expresso especialmente em células endoteliais angiogénicas. A sua indução é responsável pela regulação do efeito de VEGF, no fenómeno de proliferação e migração das células endoteliais, aparentando ter um maior efeito estimulador na produção de sinais de crescimento (Schams & Berisha, 2004; Celik-Ozenci *et al.*, 2003 citados por Bruno *et al.*, 2009). O recetor VEGFR-1 não altera a sua expressão ao longo do ciclo éstrico (Schams & Berisha, 2004). Está presente em

células endoteliais quiescentes e em proliferação, induzindo, por ação de VEGF, a formação de vasos sanguíneos (Berisha *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2009).

A LH e o IGF-1 são potentes estimuladores da expressão de mRNA de VEGF e da sua secreção, nas células da granulosa. O VEGF partilha a mesma via de sinalização do processo de luteinização, caracterizada pela produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e ativação da fosfoquinase A (PKA), demonstrando que existe uma relação temporal e espacial entre estes processos fisiológicos (Schams & Berisha, 2004).

#### **1.1.2.2 Família FGF**

O FGF-1 encontra-se nas células lúteas do CL maduro, enquanto a FGF-2 apresenta concentrações elevadas no citoplasma de células endoteliais, no início e no fim da fase lútea e após luteólise. A partir dos dias 8-12, o FGF-2, passa a ser encontrado no citoplasma de células lúteas (Schams *et al.*, 1994 citados por Schams & Berisha, 2004; Berisha & Schams, 2005). Estas observações indicam que o FGF-2 é um fator dominante para o crescimento endotelial (Gospodarowicz *et al.*, 1985; Schams & Berisha, 2004; Berisha & Schams 2005; Bruno *et al.*, 2009). É essencial para a formação da rede capilar, tem efeitos anti-apoptóticos e favorece a produção de outros fatores (Lynch *et al.*, 2000; Galvão, Ferreira-Dias & Skarzynski, 2013). O FGF-2 e VEGF têm efeitos sinérgicos, produzindo uma resposta angiogénica mais forte e rápida que cada fator individualmente (Bruno *et al.*, 2009; Galvão, Ferreira-Dias & Skarzynski, 2013). A PGF<sub>2α</sub> tem uma ação moduladora sobre o FGF-2, pois aumenta a sua expressão no início da fase lútea. Ou seja, nesta fase a PGF<sub>2α</sub> promove a vascularização e crescimento do CL (Galvão, Ferreira-Dias & Skarzynski, 2013).

#### **1.1.2.3 Família IGF**

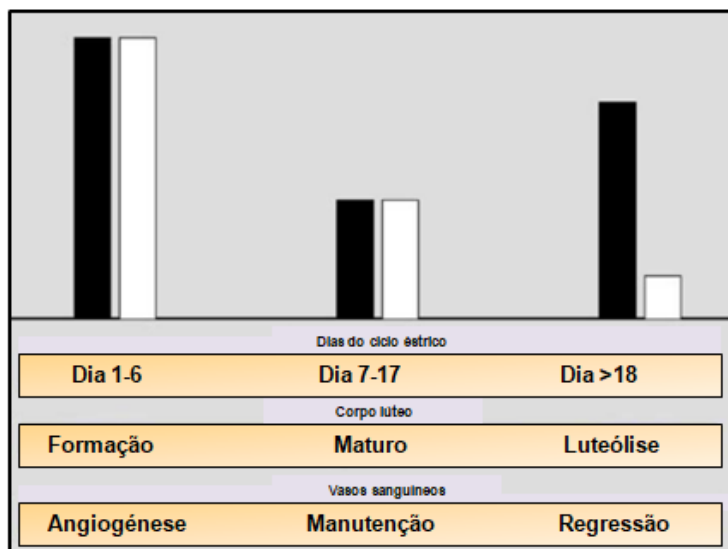
No início da fase lútea, regista-se um aumento do mRNA de IGF-1, IGF-2 e do recetor IGF (IGFR), que é seguido por um decréscimo dos mesmos (Schams & Berisha, 2004; Berisha & Schams, 2005). O CL bovino expressa, essencialmente, mRNA de IGF-1 (Woad *et al.*, 2000). O IGF-2 é encontrado nos pericitos, tendo efeitos diretos na estabilização dos capilares (Amselgruber *et al.*, 1994; Schams & Berisha, 2004). Assim sendo, o sistema IGF pode apresentar um efeito direto e indireto na angiogénese, pois estimula a produção VEGF pelas células lúteas e tem ações sobre a diferenciação e proliferação de células endoteliais (Schams & Berisha, 2004; Schams *et al.*, 2001 citados por Berisha & Schams, 2005; Bruno *et al.*, 2009). Está também envolvido na luteinização das células da granulosa e, na estimulação de ocitocina (OT) e P<sub>4</sub> (Schams, 1987 citado por Berisha & Schams, 2005). A sua função é modulada por proteínas de ligação IGF (IGFBP), cuja expressão de mRNA é evidenciada no CL bovino, com diferenças entre si (Schams *et al.*, 2002 citados por Schams & Berisha, 2004; Berisha & Schams, 2005). O aumento da expressão de IGFBP-3 correlaciona-se com o aumento da expressão de IGF-1, IGF-2 e IGFR-1 no início do desenvolvimento lúteo (dias 1-4) e sua diminuição quando o CL está maduro. Esta proteína

de ligação é o principal transportador e reservatório de IGF dentro do compartimento intravascular (Schams & Berisha, 2004).

#### 1.1.2.4 Família das Angiopoetinas

As ANPT-1, ANPT-2 e seus recetores *Tie1* e *Tie2*, assumem um papel essencial tanto na angiogénese como na angiólise (Goede *et al.*, 1998 citados por Schams & Berisha, 2004). O sistema ANPT-*Tie* atua em conjunto com outros fatores de crescimento, como por exemplo, o VEGF. A ANPT-1 é responsável pela estabilização e manutenção dos vasos sanguíneos (Yancopoulos *et al.*, 2000; Schams & Berisha, 2004). A ANPT-2, antagonista de ANPT-1, destabiliza a estrutura vascular, estando envolvida na sua remodelação ativa. Ambas se ligam ao recetor *Tie2*. O rácio ANPT-2/ANPT-1 vai ditar a propensão de ocorrer a destabilização ou não da rede capilar, predispondo-a ao fenómeno de angiogénese ou regressão capilar (Figura 4). Uma elevação do rácio ANPT-2/ANPT-1 resulta numa destabilização vascular, que na presença de VEGF, resulta na formação de novos vasos sanguíneos (fase de desenvolvimento do CL). Se o VEGF estiver ausente ocorrerá uma regressão da rede capilar lútea (Schams & Berisha, 2004; Berisha & Schams, 2005). A expressão de mRNA da ANPT-1 altera-se consoante a fase do ciclo éstrico, mas a ANPT-2 não modifica a sua expressão. A expressão do recetor *Tie2* diminui ao longo do ciclo éstrico (Tanaka *et al.*, 2004).

Figura 4 – Expressão do rácio ANPT2/1 (barras pretas) e VEGF (barras brancas) durante a formação, manutenção e luteólise do CL (adaptado de Schams & Berisha, 2005)



O fluxo sanguíneo diminui imediatamente após a ovulação e, devido aos processos acima descritos, aumenta gradualmente e em paralelo com o aumento do volume do tecido lúteo e a concentração plasmática da  $P_4$ , nos dias 2-5 do ciclo éstrico (Acosta *et al.*, 2003; Acosta & Miyamoto, 2004; Schams & Berisha, 2004).

A enzima conversora de angiotensina está presente nas células endoteliais de vasos sanguíneos do CL em desenvolvimento. É responsável pela conversão de Ang I em Ang II que, como já foi referido, é um potente péptido vasoativo (Acosta & Miyamoto, 2004; Bruno *et al.*, 2009). A Ang II induz a neovascularização e melhora a atividade angiogénica do VEGF em células microvasculares de bovinos (Otani *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2009). Também é responsável pela estimulação da produção de  $P_4$  e  $PGF_{2\alpha}$ . As interações entre a Ang II e a  $P_4$  aumentam a capacidade de produção de progesterona pelas células lúteas esteroidogénicas. O FGF e VEGF estimulam a secreção de Ang II,  $PGF_{2\alpha}$  e  $P_4$ , *in vitro* (Acosta & Miyamoto, 2004).

Desta forma, é importante ter em conta que os fatores de crescimento implicados na angiogénese, tais como a Ang II, também têm efeitos na manutenção da secreção da progesterona (Acosta & Miyamoto, 2004).

## 1.2 Luteinização

Os reguladores endócrinos clássicos da luteinização são a LH e a GH, hormonas luteotrópicas primárias que suportam o desenvolvimento e função do CL (Schams & Berisha, 2004). Os seus efeitos são precedidos por um aumento do mRNA que codifica os seus recetores (Kobayashi *et al.*, 2011). A luteinização define-se por uma diferenciação morfológica e bioquímica das células foliculares com alteração da sua via de esteroidogénese, isto é, a substituição da produção de estradiol pela da progesterona, durante o pico de LH (Niswender *et al.*, 1994; Niswender *et al.*, 2000).

A produção de estradiol é levada a cabo pela ação coordenada das células da teca interna e células da granulosa, em resposta ao estímulo de LH ao nível dos seus recetores membranares específicos (Ginther *et al.*, 1996; Bao & Garverick, 1998; Campbell, 2009). As células da teca interna são responsáveis pela produção de androgénios, como a androstenediona, que serve como substrato para a síntese de estradiol. Os androgénios são formados por ação do complexo enzimático citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase/17,20 liase (P450c17) sobre as progestinas, pregnolona e progesterona. Estas últimas previamente geradas nas duas camadas celulares do folículo, por ação do citocromo P450 que faz a clivagem da cadeia lateral do colesterol, designado por P450<sub>scc</sub> (Ginther *et al.*, 1996; Bao & Garverick, 1998). Os androgénios difundem-se pelos espaços intercelulares e são utilizados pelas células da granulosa na síntese de estradiol-17 $\beta$ , por ação do complexo enzimático citocromo P450 aromatase (P450 arom), que só está presente no folículo neste estrato celular (Ginther *et al.*, 1996; Bao & Garverick, 1998; Campbell, 2009).

O pico pré-ovulatório de LH vai induzir alterações epigenéticas nas células da granulosa e da teca interna, tais como metilações do DNA e modificações de histonas. O resultado final são alterações locais na estrutura da cromatina, tornando-a mais ou menos condensada, provocando o respetivo silenciamento ou ativação de genes que codificam as enzimas



envolvidas na esteroidogénese (Vanselow & Fürbass, 2010). Após a ovulação, observa-se um aumento da expressão de mRNA de P450<sub>scc</sub> e de 3β HSD, responsáveis por produção de P<sub>4</sub> e, diminuição de P450c17 e P450 arom, essenciais para a síntese de estrogénio. Este fenómeno está associado a um aumento da concentração celular de lípidos, como colesterol e ésteres (Bao & Garvenick, 1998; Pescador, Stocco & Murphy, 1999; Niswender *et al.*, 2000; Acosta *et al.*, 2003; Berisha & Schams, 2005; Amaya, 2010).

Simultaneamente ocorre uma remodelação celular com migração das células da teca, fibroblastos e células endoteliais durante o desenvolvimento do CL na maioria dos mamíferos não primatas. Todas estas células estão intensamente misturadas e, por isso mesmo, em contato umas com as outras (Niswender *et al.*, 2000; Skarzynski, Jaroszewski & Okuda, 2001).

Os mecanismos de remodelação celular incluem uma hipertrofia das células da granulosa, hiperplasia das células da teca interna e dos fibroblastos que constituem o tecido conjuntivo e, como já foi referido, um aumento do fluxo sanguíneo. Todos eles são regulados pela ação de hormonas, LH e GH, que promovem a expressão de genes que codificam proteínas em cada um dos processos e, fatores de crescimento, nomeadamente, FGF, IGF, entre outros (Niswender *et al.*, 2000; Schams & Berisha, 2004; Amaya, 2010). A remodelação funcional e estrutural da matriz extracelular é influenciada pela ação das metaloproteinases (MMP) e do plasminogénio. Assim sendo, após esta diferenciação, as células da teca interna vão dar origem às células lúteas pequenas (SLC) e as células da granulosa originam as células lúteas grandes (LLC) (Niswender *et al.*, 2000; Berisha & Schams, 2005).

Segundo Niswender (2002), as SLC de ovelhas têm cerca 20 µm de diâmetro, com maior número de recetores LH e com capacidade de aumento de 5 a 15 vezes da produção de P<sub>4</sub>, contêm frequentemente gotículas de lípidos no seu citoplasma. As LLC têm mais de 20 µm de diâmetro, produzem níveis basais ou elevados de P<sub>4</sub> e possuem recetores LH, mas não respondem com aumento de produção de progesterona. Têm recetores de PGF<sub>2α</sub>, que ativa outras vias de segundos mensageiros, particularmente, a ativação da fosfoquinase C (PKC) e aumento do cálcio livre no citosol, responsáveis pelo fenómeno de apoptose. Ambas as células contêm recetores para outras hormonas e fatores reguladores que podem ser ou não específicos da célula. As LLC apresentam maior número de recetores GH (Lucy *et al.*, 1993; Schams & Berisha, 2004), ao contrário das SLC que possuem mais recetores LH (Schams & Berisha, 2004). No início do desenvolvimento lúteo, a GH é um estimulador mais potente da síntese de PGF<sub>2α</sub> e de P<sub>4</sub>, que a LH (Kobayashi *et al.*, 2001).

No final do desenvolvimento, vamos ter um CL constituído por LLC, SLC, células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas e células do sistema imunitário (O'Shea *et al.*, 1989; Niswender *et al.*, 2000; Schams & Berisha, 2004; Ferreira & Martin, 2009). Sendo que as LLC representam 40% do volume do CL, mas só constituem 10% do total de células; as SLC

ocupam 20% do volume total e 25% do número de células; por último, as células endoteliais constituem 10% do volume, mas são 50% das células que constituem o CL (Wiltbank, 1994).

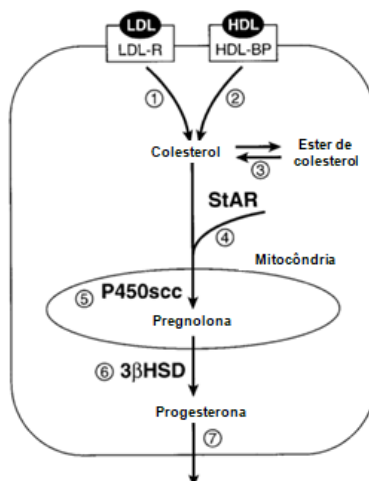
### 1.2.1 Produção de progesterona

O substrato da síntese da  $P_4$  é o colesterol. Este é, em condições normais, sintetizado pelo fígado e transportado para órgãos com capacidade esteroidogénica (suprarrenais, folículos ovários, corpo lúteo e testículos) por lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de elevada densidade (HDL) (Pate & Condon, 1994; Niswender *et al.*, 2000; Niswender, 2002; Tomac, Ceknović & Arapović, 2011).

A LDL penetra na célula lútea por endocitose com auxílio de um recetor (LDL-R) formando um endossoma. Este funde-se com um lisossoma e, após ação enzimática, o LDL dissocia-se do seu recetor e há libertação do colesterol que fica livre no citosol. A HDL liga-se a uma proteína de ligação (HDL-BP) presente na membrana celular e o colesterol é libertado para o interior da célula (Lestavel & Fruchart, 1994 citados por Niswender *et al.*, 2000).

Uma vez livre no citosol o colesterol tem três destinos possíveis (Niswender, 2000). É utilizado como substrato na esteroidogénese (Niswender, 2002; Stocco, Telleria & Gibori, 2007) ou é envolvido na formação da membrana plasmática (Jonhson, Phillips & Rothblat, 1997 citados por Niswender *et al.*, 2000). Ou ainda, pode ser armazenado após esterificação com ácidos gordos de cadeia longa, por ação da colesterol-esterase, originando gotículas lipídicas citoplasmáticas (Jonhson, Phillips & Rothblat, 1997 citados por Niswender *et al.*, 2000; Tomac, Ceknović & Arapović, 2010). Quando necessário, a colesterol hidrolase é ativada por fosforilação pelo PKA e torna o colesterol disponível (Niswender *et al.*, 2000).

Figura 5 – Via da biossíntese da progesterona na célula lútea (adaptado de Niswender *et al.*, 2000)



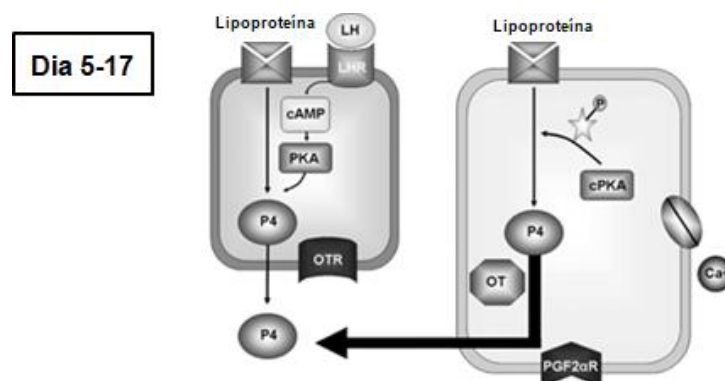
Quando utilizado na esteroidogénese, o colesterol é transportado para a mitocôndria por proteínas transportadoras de esteróides e pela fosforilação de proteínas do citoesqueleto (Scallen *et al.*, 1985; Ikonen, 1997 citados por Niswender *et al.*, 2000; Niswender, 2002).

O fator limitante da taxa de transporte é a passagem do colesterol da membrana externa para a membrana mitocondrial interna, estando as vias de segundos mensageiros envolvidas na sua modulação (Belfiore *et al.*, 1994). Nesta fase, estão envolvidos a proteína de regulação aguda da esteroidogénese (StAR), os recetores periféricos de benzodiazepina (PBR) e o seu ligando natural, a endozepina. Sucintamente, a StAR expõe o colesterol ao PBR que é responsável pela passagem para a membrana mitocondrial interna. A endozepina tem influência neste processo através da ativação do PBR ou melhorando as interações entre a StAR e PBR, por influência no papel estimulador do PKA (Niswender, 2002; Stocco, Telleria & Gibori, 2007).

Quando na membrana mitocondrial interna, o colesterol fica exposto ao complexo enzimático P450<sub>scc</sub> que faz a clivagem da cadeia lateral do colesterol, dando origem à pregnolona. Esta é transportada para o retículo endoplasmático liso e, por ação da 3 $\beta$  HSD, forma-se a P<sub>4</sub>, que abandona a célula por difusão (Figura 5) (Niswender *et al.*, 2000; Niswender, 2002; Tomac, Ceknović & Arapović, 2011).

De uma maneira geral, sabe-se que a regulação da síntese de P<sub>4</sub> a longo-prazo, pelas células lúteas, ocorre por ação de hormonas luteotrópicas (LH e GH) e luteolíticas (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), que modulam a síntese de mRNA das enzimas esteroidogénicas, como já foi anteriormente descrito. Porém, estas mesmas hormonas também regulam a síntese de P<sub>4</sub> de um modo agudo, atuando sobre a taxa de transporte da membrana mitocondrial externa para a interna (Schemm *et al.*, 1990; Juengel *et al.*, 1995; Niswender, 2002). A fosforilação por PKA da StAR e PBR melhora a capacidade de transporte do colesterol para a membrana interna. No entanto, se a fosforilação for por PKC ocorrerá o efeito contrário (Niswender *et al.*, 2000; Niswender, 2002; Tomac, Ceknović & Arapović, 2011). Como sabemos, as LLC produzem elevadas concentrações basais de progesterona e possuem poucos LHr, ao contrário das SLC. O efeito de LH é maior nas SLC que nas LLC, mas é a P<sub>4</sub> produzida pelas LLC a que contribui fortemente para a concentração serológica desta hormona (Schwall, Sawyer & Niswender, 1986). Foi evidenciada uma maior concentração de endozepina nas LLC, enquanto a concentração de StAR era igual nos dois tipos celulares. Após a incubação de LLC e de SLC com agonistas dos PBR, registou-se um aumento da síntese de P<sub>4</sub> pelas SLC, o que significa que a endozepina tem relevância na esteroidogénese (Niswender, 2002). Esta diferença pode explicar o facto de existir uma maior produção de níveis basais de P<sub>4</sub> pelas LLC (Niswender *et al.*, 2000; Niswender, 2002).

Figura 6 – Mecanismos de regulação intracelulares das LLC e SLC da função lútea do CL maturo  
(adaptado de Niswender *et al.*, 2007)



### 1.3 Luteólise

A luteólise caracteriza-se por uma perda de função e subsequente involução da estrutura lútea (Sugino & Okuda, 2007). Numa primeira fase, denominada por luteólise funcional, ocorre perda da capacidade de síntese e secreção de progesterona por parte das células esteroidogénicas. Após declínio dos níveis de progesterona ocorre a luteólise estrutural, que consiste na regressão morfológica do CL (Neuvians *et al.*, 2004; Sugino & Okuda, 2007). Este fenómeno é essencial para o restabelecimento de uma ciclicidade normal quando não há gestação, visto que permite a formação de um novo folículo ovulatório (Sugino & Okuda, 2007).

A regressão lútea depende da exposição repetida do CL à  $PGF_{2\alpha}$ , produzida inicialmente pelo útero (Schams & Berisha, 2004; Pate, Johnson-Larson & Ottobre, 2012). É através de um mecanismo de contracorrente que a  $PGF_{2\alpha}$  circula da veia uterina diretamente para a artéria ovárica do ovário ipsilateral, passando pelo plexo útero-ovárico. Desta forma, evita-se que a  $PGF_{2\alpha}$  seja metabolizada pelo pulmão (Berisha & Schams 2004; Amaya, 2010; Lee *et al.*, 2010). A sua síntese endometrial implica a ação coordenada de dois processos independentes, o aumento da capacidade de síntese de prostaglandinas e o aumento do número de recetores de ocitocina (OTR) (Goff, 2004).

A capacidade de promoção da luteólise implica o estabelecimento de interações entre diversos tipos células heterogénicas que se encontram no CL. Estas parecem estar envolvidas na síntese de citocinas que estimulam a produção de  $PGF_{2\alpha}$  em células lúteas. Estudos realizados *in vitro* demonstraram que o efeito inibitório da  $PGF_{2\alpha}$  sobre a esteroidogénese de células lúteas, pode ser potenciado pela presença de células endoteliais e células do sistema imunitário (Vonnham *et al.*, 2006; Korzekwa *et al.*, 2008; Pate, Johnson-Larson & Ottobre, 2012).

Para entendimento do desenrolar da luteólise é importante ter em conta dois factos referentes ao endométrio e CL. Em primeiro lugar, é o período de tempo que o endométrio está exposto à  $P_4$  que determina a longevidade da fase lútea. O segundo facto é que a secreção de  $PGF_{2\alpha}$  pelo endométrio só ocorre quando este está responsivo à ocitocina

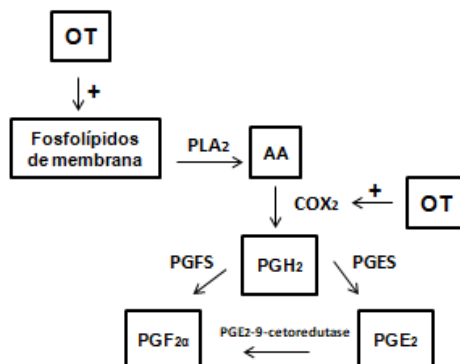
(Goff, 2004). Desta forma, entende-se que a síntese deste tipo de prostaglandina no endométrio é regulada por esteróides ováricos, a progesterona e estrogénios (Goff, 2004; Pate, Johnson-Larson & Ottobre, 2012). A ocitocina estimula a libertação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  para a veia uterina, mas o seu papel na luteólise é controverso (Pate, Johnson-Larson & Ottobre, 2012).

### 1.3.1 Produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio

A indução de recetores do estradiol (ER) assume um papel central nos mecanismos que dão início à libertação pulsátil de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Wiltbank *et al.*, 2016b). As concentrações crescentes de estradiol produzido pelo FPO vão estimular a libertação de ocitocina hipofisária. Esta, por sua vez, vai estimular a secreção uterina de pequenas quantidades de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . É desta forma que se inicia um *loop* de *feedback* positivo de libertação de ocitocina,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina e lútea, de que depende a luteólise (Silvia *et al.*, 1991; McCracken *et al.*, 1996; Niswender *et al.*, 2000). O estradiol afeta a magnitude, o *timing* e o padrão pulsátil de secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , mas não é necessário para a sua manutenção (Beard & Lamming, 1994; Pugliesi *et al.*, 2012). Ocorre um aumento dos ER endometriais no fim da fase lútea, promovido em parte pelo próprio estradiol (Robinson *et al.*, 2001). O  $\text{E}_2$  não está envolvido diretamente na regulação positiva e espontânea dos OTR, embora facilite este processo por aumento da velocidade de transcrição do gene do OTR (Leung & Wathes, 2000; Robinson *et al.*, 2001; Wiltbank *et al.*, 2016b).

A  $\text{P}_4$  regula a secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  de diferentes formas. Promove a acumulação de ácido araquidónico (AA) e cicloxigenase (COX) no endométrio e, exibe um efeito supressivo na secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Mann & Lamming, 1995; Silvia *et al.*, 2001; Goff, 2004). Tem uma ação inibidora sobre a expressão do gene de OTR durante o início e maioria da fase lútea e, após 12 dias, perde-se o efeito por perda de recetores de  $\text{P}_4$ , tornando o endométrio responsivo à OT (Lamming & Mann, 1995; Schams & Berisha, 2004). Kindahl, Lindell & Edqvist (1981), citados por Goff (2004), concluíram que para haver secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pelo endométrio, teria que haver libertação de níveis basais de  $\text{P}_4$ , visto que, a remoção do CL, na altura da luteólise, leva à perda de capacidade de secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

Figura 7 – Síntese de prostaglandinas no endométrio (adaptado de Goff, 2004)



O substrato da síntese de prostaglandinas é o ácido araquidónico (AA). A sua libertação ocorre após hidrólise dos fosfolípidos membranares por ação da fosfolipase A2 e C. Por ação da prostaglandina G/H sintetase, também denominada por ciclogénase (COX), ocorre a catalisação da conversão do AA em prostaglandina  $H_2$  (PGH<sub>2</sub>), metabolito intermediário comum à biossíntese de várias prostaglandinas. Por ação da PGFS, a PGH<sub>2</sub> é convertida em PGF<sub>2α</sub> (Watanabe *et al.*, 1985; Niswender *et al.*, 2000; Arosh, Banu & McCracken, 2016). De uma maneira geral, a concentração de OTR endométricos está suprimida pela ação da P<sub>4</sub>. À medida que ocorre uma diminuição dos níveis plasmáticos desta hormona, há um aumento do número de OTR no endométrio, que leva à produção de PGF<sub>2α</sub> que dá início à luteólise. O estradiol, por si só, não consegue dar início à regressão lútea, mas quando associado ao declínio da P<sub>4</sub>, facilita a expressão do gene do OTR (Leung & Wathes, 2000; Robinson *et al.*, 2001; Kombé, Sirois & Goff, 2003; Goff, 2004; Wiltbank *et al.*, 2016). Assim, o estradiol induz uma regulação a curto prazo da síntese de OTR, visto que os seus efeitos não se verificam por mais de um ou dois dias. O efeito do estradiol sobre o endométrio vai depender do período de tempo em que este esteve sob ação da P<sub>4</sub>. Num estudo realizado *in vitro* verificou-se que nas células a ela expostas, durante 10 ou menos dias, quando inoculadas com estradiol, havia uma inibição da expressão de OTR. Mas, passados esses 10 dias, o seu efeito passava a ser estimulador e, após 24 horas, a concentração de OTR era máxima. Este resultado coincidiu com o efeito máximo do estradiol sobre a estimulação de PGF<sub>2α</sub> por OT (Kombé, Sirois & Goff, 2003). As prostaglandinas também têm a capacidade de ativar de forma parácrina e autócrina a expressão de OTR (Goff, 2004).

### **1.3.2 Produção de PGF<sub>2α</sub> pelo corpo lúteo**

A síntese lútea PGF<sub>2α</sub> é um componente importante do *loop* de *feedback* positivo entre o útero e CL durante a luteólise (Arosh, Banu & McCracken, 2016). Durante o final da fase lútea, a PGF<sub>2α</sub> de origem periférica estimula a sua síntese pelo CL. Foi demonstrado por Tsai & Wiltbank (1998), que a PGF<sub>2α</sub> induz a expressão do mRNA da COX2, *in vivo*, cerca de 11 dias após a ovulação. Promove também, a libertação de AA, por ativação da fosfolipase C e aumento do cálcio livre no citosol. O cálcio tem a capacidade de aumentar a atividade enzimática das fosfolipases A2 e C (Niswender *et al.*, 2000). Esta disponibilidade de AA e a atividade da COX determina a capacidade de síntese de prostaglandinas no CL em resposta à PGF<sub>2α</sub> em circulação. A que é produzida localmente pelo CL induz luteólise por mecanismos autócrinos e parácrinos (Auletta & Flint, 1988; Niswender *et al.*, 2000).

### **1.3.3 Luteólise funcional**

A quebra dos níveis de P<sub>4</sub> não ocorre por diminuição do número de células esteroideogénicas. As alterações nos valores celulares ocorrem após a alteração da concentração daquela hormona (Branden, Gamboni & Niswender, 1988). O que quer dizer

que, muito provavelmente, ela é devida a uma diminuição do fluxo sanguíneo e da capacidade esteroidogénica da célula lútea (Niswender *et al.*, 2000).

Existe uma correlação entre a diminuição do fluxo sanguíneo ovárico e a concentração sistémica de  $P_4$  (Ford & Chenault, 1981; Schams & Berisha, 2004). Assim, as células endoteliais estão envolvidas na cascata de eventos que levam à luteólise funcional (Pate, Johnson-Larson & Ottobre, 2012).

Acosta *et al.* (2002) verificaram que o fluxo sanguíneo no CL aumenta entre 30 minutos a 2 horas após a administração da  $PGF_{2\alpha}$ . Após 8 a 48 horas, é que começa a diminuir progressivamente até atingir valores mínimos, ainda mais baixos que o fluxo sanguíneo verificado na altura de administração da  $PGF_{2\alpha}$ . Simultaneamente, as concentrações plasmáticas de  $P_4$  diminuem de 4,7 (às 0 horas) para 0,6 ng/mL (às 24 horas). É este incremento de fluxo sanguíneo que, possivelmente, dá início à cascata luteolítica. O mecanismo que leva a este acontecimento ainda não é conhecido, mas pensa-se que pode envolver a estimulação de  $PGE_2$  e  $PGF_{2\alpha}$ , visto que se observa um aumento da COX2 e, também, a presença de óxido nítrico (NO) (Acosta & Miyamoto, 2004; Vonnahme *et al.*, 2006).

As células endoteliais apresentam recetores de elevada afinidade à  $PGF_{2\alpha}$ , ou seja, é exercida uma ação direta sobre elas. Ocorre uma degenerescência celular, que resulta numa diminuição marcada da densidade capilar e redução do fluxo sanguíneo do parênquima lúteo. O resultado final é a luteólise por privação de nutrientes, de substratos da esteroidogénese e do suporte luteotrópico (Branden, Gamboni & Niswender, 1988; Mamluk *et al.*, 1998; Niswender *et al.*, 2000). Os péptidos vasoativos, ET-1 e Ang II, são possíveis mediadores da ação da  $PGF_{2\alpha}$ , visto que, se encontram predominantemente nas LLC, após a sua administração. Atuam como vasoconstritores durante a luteólise funcional, mas também como indutores dos fenómenos de apoptose, tanto na regressão lútea funcional como na estrutural (Schams *et al.*, 2003). A  $PGF_{2\alpha}$  potencia, pois, a atividade inibidora da ET-1 sobre a libertação de  $P_4$  e estimula a libertação de Ang II (Miyamoto *et al.*, 1997; Berisha & Schams 2004).

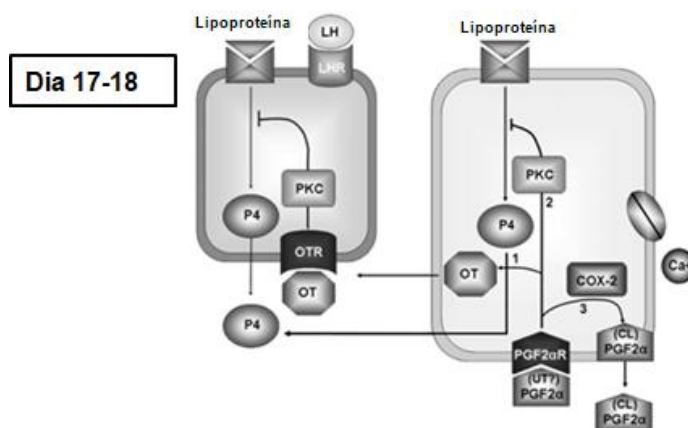
Os fatores de crescimento atuam sobre o destino, vida ou morte, das células endoteliais. O efeito luteolítico de  $PGF_{2\alpha}$  pode depender da inibição dos efeitos de FGF-2 como promotor da angiogénese (Pate, Johnson-Larson & Ottobre, 2012; Zalman *et al.*, 2012). Este facto pode ser explicado pelas observações feitas por Vonnahme *et al.* (2006). Estes verificaram que, após indução da luteólise, havia um aumento inicial da expressão de FGF-2. O que significa que este fator está envolvido na luteólise funcional, visto que após 12 horas a sua expressão ainda se mantém e já há uma diminuição das células endoteliais (Schams & Berisha, 2004; Vonnahme *et al.*, 2006). Segundo Redmer & Reynolds (1996), o FGFR-1 apresenta elevadas concentrações nas células parenquimatosas no início e durante a fase lútea, diminuindo durante a regressão do CL. Nas células endoteliais está sempre presente

e, no fim do ciclo éstrico, encontra-se em abundância, nos microvasos lúteos de maior calibre. O FGFR-2 é encontrado nas células lúteas e só está presente na vasculatura do CL, no final do ciclo éstrico, nos vasos de maior calibre. Estes microvasos mantêm-se no CL durante a sua regressão e pensa-se estarem envolvidos na reabsorção tecidular. Desta forma, se o FGF inibe a morte celular, um aumento seletivo dos seus recetores nas células endoteliais nestes vasos explicaria como é que eles são mantidos, enquanto os restantes regredem.

Em resposta à presença de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , registou-se um aumento do *transforming growth factor*  $\beta$  ( $\text{TGF}\beta$ ) nas células endoteliais lúteas. As suas ações incluem perda de contato celular, aumento da permeabilidade capilar e inibição da proliferação celular (Maroni & Davis, 2011). O sistema IGF também tem influência sobre os eventos luteolíticos estimulados pela  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Deste modo, ocorrem aumentos de mRNA de IGFBP-1 (luteólise funcional), IGFBP-2, IGFBP-5 e IGFBP-6 (luteólise estrutural), implicando o seu envolvimento neste processo (Neuvians *et al.*, 2003).

As LLC possuem recetores para  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e a sua ligação promove uma ativação da fosfolipase C (Juengel *et al.*, 1996; Niswender *et al.*, 2000; Niswender, 2002). Esta catalisa a hidrólise do fosfolípido 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) e 1,2-diacylglicerol (DAG). O aumento dos níveis de IP3 citosólico provoca uma libertação de cálcio pelo REL (Davis *et al.*, 1988; Niswender *et al.*, 2000; Amaya, 2010). Tanto o aumento do cálcio livre como o do DAG estimula a atividade catalítica de PKC dependente de cálcio. A PKC possui diversas ações anti-esteroidogénicas nas LLC, tais como, alterações pós-translacionais de proteínas envolvidas na esteroidogénese, na disponibilidade de colesterol, na manutenção da matriz extracelular e pode, ainda, facilitar o início da apoptose celular (Davis *et al.*, 1988; McGuire, Juengel & Niswender, 1994; Niswender *et al.*, 2000; Amaya, 2010).

Figura 8 – Mecanismos de regulação intracelular das LLC e SLC da função lútea durante a luteólise funcional (adaptado de Niswender *et al.*, 2007)







As primeiras alterações morfológicas implicam uma diminuição da dimensão e número de LLC e, só depois, é que as SLC começam a desaparecer (Braden, Gamboni & Niswender, 1988). Estas alterações só são evidentes cerca de 24 a 36 horas após exposição à PGF<sub>2α</sub>, sendo que nesta fase a capacidade esteroidogénica já está marcadamente afetada (Sawyer *et al.*, 1990; Neuvians *et al.*, 2004; Vonnahme *et al.*, 2006). As células endoteliais são as primeiras a sofrerem alterações morfológicas extremas e indicativas de apoptose (Sawyer *et al.*, 1990; Niswender *et al.*, 2000).

A apoptose das células lúteas está pois, na base da regressão estrutural (Sugino & Okuda, 2007). Trata-se de um processo ativo que envolve a utilização de energia, em que as células que já não são essenciais ao funcionamento de um tecido induzem a própria morte (Kerr, Wyllie & Currie, 1972 citados por Niswender *et al.*, 2000). Inclui fragmentação nuclear, aparecimento de membranas vesiculares citoplasmáticas, fragmentação do DNA genómico e alteração da expressão génica (Niswender *et al.*, 2000; Johnson & Bridgham, 2002; Al-Gubory *et al.*, 2012).

O recetor *Fas* é uma proteína existente na superfície celular, que modula a apoptose. O seu ligando é expresso predominantemente nos linfócitos T ativados e, posteriormente, ir-se-á ligar ao *Fas* presente na superfície das células lúteas, ativando a apoptose (Nagata & Golstein, 1995; Taniguchi, Yokomizo & Okuda, 2002). A expressão do *Fas* na superfície das células lúteas é estimulada por citocinas, INF- $\gamma$  e pela sua combinação com TNF $\alpha$ , produzidas por células imunes, e é inibida pela P<sub>4</sub> (Nagata & Golstein, 1995; Taniguchi, Yokomizo & Okuda, 2002; Okuda *et al.*, 2004). Este sistema é responsável pela ativação da caspase-8 que, por sua vez, ativa a caspase-3. Estas, são enzimas com forte ação proteolítica e responsáveis pela ativação de DNases, que degradam o DNA (Sugino & Okuda, 2007; Amaya, 2010).

A proteína *bcl-2* também está envolvida na mediação da apoptose. Encontra-se associada à membrana celular mitocondrial e previne a morte celular, por regulação de mecanismos homeostáticos do cálcio, atenuação do stress oxidativo e interação com *bax* (Niswender *et al.*, 2000; Stocco, Telleria & Gibori, 2007; Sugino & Okuda, 2007). Esta antagoniza os efeitos da *bcl-2* e promove diretamente a apoptose. O rácio *bcl-2/bax* relaciona-se com o potencial da célula para desencadear a apoptose (Rueda *et al.*, 1997; Sugino *et al.*, 2000; Sugino & Okuda, 2007). A proteína nuclear p53 é responsável por estimular a transcrição do gene da *bax* (Rueda *et al.*, 1997).

As ROS (*reactive oxygen species*) também são mediadoras da apoptose. Estas têm origem, sobretudo, durante a formação da ATP, ou seja, durante a fosforilação oxidativa da cadeia respiratória mitocondrial. Também surgem nas reações enzimáticas envolvidas no metabolismo do AA, por exemplo da COX, e do complexo enzimático mitocondrial citocromo P450, entre outras. Fazem parte das ROS, o anião radical superóxido, o radical hidroxilo, o peróxido de hidrogénio, o peroxinitrito, entre outros. As ROS lúteas podem funcionar como



presentes num CL maturo e num CL em regressão (Pate, Johnson-Larson & Ottobre, 2012; Poole & Pate, 2012).

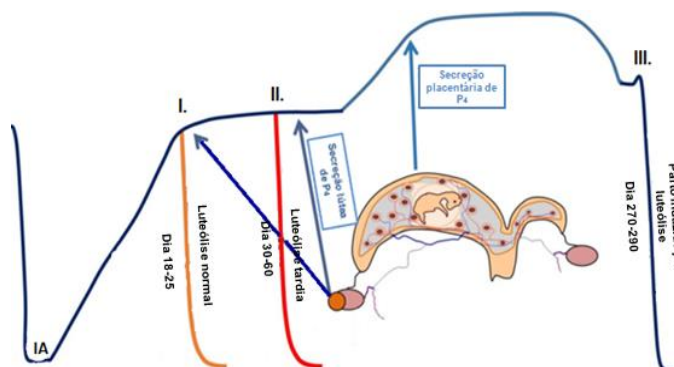
Os macrófagos são responsáveis pela fagocitose das células em degenerescência e pela degradação da matriz extracelular. Produzem o  $\text{TNF}\alpha$ , envolvido no início da luteólise e na inibição da esteroidogênese. Juntamente com os fibroblastos e células endoteliais libertam a IL-1, que estimula a síntese de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pelo CL (Nothnick & Pate, 1990; Niswender *et al.*, 2000; Sugino & Okuda, 2007). Os linfócitos T libertam INF- $\gamma$ , que atua sinergicamente com  $\text{TNF}\alpha$  para o aumento da secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  lútea (Benyo & Pate, 1992; Sugino & Okuda, 2007). A combinação de  $\text{TNF}\alpha$  e INF- $\gamma$  é altamente citotóxica (Petroff, Petroff & Pate, 2001; Taniguchi *et al.*, 2002).

As células imunológicas modulam a esteroidogênese das células lúteas ou a sua viabilidade através de fatores parácrinos. O mRNA de  $\text{TNF}\alpha$  e do INF- $\gamma$  aumenta durante a luteólise, nas LLC, nas SLC, nas células endoteliais e nas imunes (Neuvians, 2004; Sakumoto *et al.*, 2011; Pate, Johnson-Larson & Ottobre, 2012). Estas duas citocinas produzem efeitos profundos nas células lúteas, tais como: inibição da produção de  $\text{P}_4$  estimulada pela LH; modulação da síntese de prostaglandinas, leucotrienos e endotelinas (Korzekwa *et al.*, 2011); indução da apoptose em células esteroidogénicas e células endoteliais. O rácio de prostaglandinas luteotrópicas e luteolíticas e sua concentração intralútea são determinantes para regressão completa do CL (Hojo *et al.*, 2010; Pate, Johnson-Larson & Ottobre, 2012).

## 2. CORPO LÚTEO E A GESTAÇÃO

Existem três períodos críticos durante a gestação que podem levar à regressão lútea. O primeiro ocorre entre os dias 17 e 25 e corresponde à fase de alongamento do concepto, em que o embrião segrega um fator responsável pela sinalização da gestação, período este também designado por reconhecimento materno da gestação; o segundo ocorre entre os dias 30 a 60, quando tem que haver um novo sinal que mantenha o CL; e, por último, entre os dias 270 e 290, que corresponde à indução do parto por luteólise (Wiltbank *et al.*, 2016b).

Figura 11 – Diagrama representativo da concentração de progesterona durante a gestação dando ênfase aos períodos decisivos de manutenção do CL (adaptado de Wiltbank *et al.*, 2016b)



## **2.1 Reconhecimento materno da gestação**

O diálogo entre o embrião em desenvolvimento e sua mãe é essencial para que a gestação se estabeleça. Este período designa-se por reconhecimento materno da gestação (Lonergan, Forde & Spencer, 2016a). Trata-se de um sinal transmitido pelo embrião que promove o bloqueio da luteólise durante o início da gestação (Wiltbank *et al.*, 2016b). Se não for bem-sucedido, ocorrerá perda embrionária precoce e a fêmea retornará à sua atividade cíclica (Spencer, Forde & Lonergan, 2015).

Nos ruminantes, o CL é mantido por um mecanismo local que exige a presença do embrião (Wiltbank *et al.*, 2016b) e envolve uma interação complexa entre o CL, o endométrio e o conceito. A  $P_4$  produzida pelo CL vai promover a secreção pelo endométrio, de inúmeras substâncias embriotróficas (Bazer *et al.*, 2010; Spencer, Forde & Lonergan, 2015), designadas no seu conjunto por histotrofo, que são responsáveis pela formação de um ambiente uterino adequado ao desenvolvimento embrionário (Mann & Lamming, 2001). Desta forma, o embrião durante o processo de alongamento deverá produzir quantidades suficientes de um sinal, designado por interferão tau (IFNT) que, entre várias ações, inibe a libertação pulsátil de  $PGF_{2\alpha}$  e estimula a produção de  $PGE_2$  pelo endométrio. Assim, a luteólise é impedida e há a manutenção morfológica e funcional do CL.

Concluindo, são as ações coordenadas, individuais e sinérgicas da  $P_4$ , prostaglandinas (PG) e IFNT que regulam os genes envolvidos no alongamento do conceito, receptividade uterina e implantação (Dorniak & Spencer, 2013; Spencer, Forde & Lonergan, 2015).

### **2.1.1 Ações da progesterona no endométrio e no alongamento do conceito**

A  $P_4$  é indispensável para que ocorra o estabelecimento e manutenção da gestação (Lonergan, Forde & Spencer, 2016a). Através das suas ações sobre o endométrio permite interações conceito-mãe e o reconhecimento materno que resulta na implantação (Lonergan, O'Hara & Forde, 2013).

Durante o ciclo éstrico e o início da gestação, a  $P_4$  induz a expressão génica no epitélio endométrico que é responsável pelo estabelecimento da receptividade uterina (Dorniak *et al.*, 2013; Dorniak & Spencer, 2013). A ausência de um conceito suficientemente desenvolvido que sinalize o reconhecimento da gestação, leva a que os genes expressos pela  $P_4$  não sejam estimulados, fazendo com que o animal retorne ao estro (Forde *et al.*, 2011; Spencer, Forde & Lonergan, 2015). A estimulação génica de fatores produzidos pelo conceito, como IFNT e prostaglandinas, levam a alterações no histotrofo que permitem a sobrevivência e o alongamento do conceito (Dorniak *et al.*, 2013; Brooks, Burns & Spencer, 2014; Spencer, Forde & Lonergan, 2015). Ou seja, o contato com o aparelho reprodutivo não é necessário para que o embrião atinja o estágio de blastocisto (Lonergan, O'Hara & Forde, 2013), mas o alongamento está dependente das secreções uterinas (Lonergan, Forde & Spencer, 2016a).

O histotrofo é segregado pelas células epiteliais, luminais e glandulares, do endométrio. É constituído por um conjunto de substâncias como proteínas, lípidos, aminoácidos, açúcares (glucose e frutose), iões e microvesículas (Bazer, Ott & Spencer, 1989; Lonergan *et al.*, 2016; Forde *et al.*, 2014, citados por Lonergan, Forde & Spencer, 2016a). Após a sua secreção, ele é transportado para o sistema vascular feto-placentário, com o objetivo de suportar o desenvolvimento do concepto (Lonergan, Forde & Spencer, 2016a).

Até ao reconhecimento materno da gestação, não há diferenças no transcriptoma endométrico de novilhas gestantes ou cíclicas (Forde *et al.*, 2011; Spencer, Forde & Lonergan, 2015). Em resposta à P<sub>4</sub> ovárica entre os dias 7 e 13, ocorrem grandes alterações uterinas que são necessárias para o alongamento do concepto e implantação, independentemente da presença do embrião (Forde *et al.*, 2011, 2012; Spencer, Forde & Lonergan, 2015).

Não há diferenças na expressão de recetores de progesterona (PR) entre vacas gestantes e cíclicas (Robinson *et al.*, 1999). Nos dias 13 e 16, há perda da expressão da proteína dos PR no epitélio uterino, luminal e glandular, respetivamente. Esta ausência associa-se a uma regulação positiva e negativa de genes expressos no endométrio (Okumu *et al.*, 2010, citados por Spencer, Forde & Lonergan, 2015), que alteram a composição do histotrofo e assim regulam o alongamento do concepto (Forde *et al.*, 2011; Bazer *et al.*, 2012; Forde *et al.*, 2012; Forde & Lonergan, 2012). Desta forma, é estimulada a proliferação e migração da trofoectoderme, que promove a sua ligação e adesão ao epitélio luminal do endométrio, dando origem a um concepto filamentososo (Bazer *et al.*, 2010; Forde & Lonergan, 2012; Dorniak & Spencer, 2013). Os marcadores comuns de recetividade uterina e reguladores do desenvolvimento do concepto, em vacas e ovelhas, são a COX2 e a IGFBP1 (Simmons *et al.*, 2009; Dorniak, 2012, citados por Spencer, Forde & Lonergan, 2015).

Em conclusão, o efeito da P<sub>4</sub> no desenvolvimento embrionário é mediado pelo endométrio (Clemente *et al.*, 2009; Lonergan, Forde & Spencer, 2016a). Assim se explica a forte correlação que existe entre o aumento pós-ovulatório da concentração P<sub>4</sub> e o desenvolvimento embrionário (Bazer *et al.*, 2010; Lonergan, 2011; Dorniak *et al.*, 2013; Spencer, Forde & Lonergan, 2015).

## **2.1.2 Ação do concepto no endométrio e na manutenção do corpo lúteo**

### **2.1.2.1 IFNT**

O IFNT é produzido pela trofoectoderme do concepto em alongamento, entre os dias 12 e 25 da gestação, particularmente antes da implantação (Robinson *et al.*, 1999; Wiltbank *et al.*, 2016a). Exerce então um efeito local que mantém funcional o CL ipsilateral ao corno gravídico, durante o início da gestação (Mappletoft, Lapin & Ginther, 1976; Moor & Rowson, 1996, citados por Antoniazzi *et al.*, 2013), o que o torna sinal responsável pelo reconhecimento materno da gestação. A sua ação impede o desenvolvimento do

mecanismo de luteólise, mantendo a integridade funcional e estrutural do CL e, consequentemente, a produção de P<sub>4</sub> (Kim *et al.*, 2003; Dorniak *et al.*, 2011, citados por Dorniak & Spencer 2013).

O efeito anti-luteolítico do IFNT é mediado pelo endométrio por ação parácrina. Previne a transcrição dos genes do ER $\alpha$  (ovelhas) e OTR (ovelhas e vacas), no epitélio luminal e glandular do endométrio (Robinson *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003). A consequência é uma alteração na secreção pulsátil de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , que se torna insuficiente para desencadear a luteólise (Spencer & Bazer, 1996, citados por Antoniazzi *et al.*, 2013; Spencer *et al.*, 2007, citados por Wiltbank *et al.*, 2016b).

Ao contrário das ovelhas, nas vacas o ER $\alpha$  e o OTR, ao nível do epitélio luminal, têm regulações temporais diferentes ao longo do ciclo éstrico. O E<sub>2</sub> promove a síntese dos seus recetores na maioria das células uterinas, exceto no epitélio luminal que parece não ser regulado por hormonas ováricas esteróides. Desta forma, justifica-se o facto de a inibição dos OTR não envolver a diminuição prévia dos ER $\alpha$ , como acontece nas ovelhas (Robinson *et al.*, 1999).

O IFNT estimula determinados genes presentes no endométrio e tecidos periféricos, como o CL, fígado e células sanguíneas (Gifford *et al.*, 2007; Antoniazzi *et al.*, 2013; Wiltbank *et al.*, 2016b). Assim, para além dos seus efeitos no endométrio, provavelmente também exerce um efeito local ou endócrino no CL (Antoniazzi *et al.*, 2013; Shirasuna *et al.*, 2015). Entre esses genes, encontram-se os estimulados por INF (*INF stimulated-gene*; ISG) clássicos e não clássicos que, como já foi referido, regulam a recetividade uterina, o alongamento do concepto e sua implantação (Bazer *et al.*, 2009; Spencer, Forde & Lonergan, 2015; Dorniak & Spencer, 2013; Antoniazzi *et al.*, 2013).

Nas vacas gestantes, o concepto regula positivamente um grande número de ISG clássicos entre os dias 15 e 18 (Bauersachs *et al.* 2012; Forde & Lonergan, 2012; Spencer, Forde & Lonergan, 2015).

#### **2.1.2.1.1 Genes estimulados pelo INF clássicos e não clássicos**

O IGS15 é um gene marcador da resposta ao INF tipo I. É regulado positivamente no endométrio, no CL e circulação periférica, nos ruminantes (Bauersachs *et al.* 2012; Antoniazzi *et al.*, 2013; Shirasuna *et al.*, 2015).

Nas ovelhas e, de forma semelhante, nas vacas, o ISG15 é expresso no epitélio luminal nos dias 10-11 do ciclo éstrico e da gestação, mas não nos dias 12-13. Durante o alongamento do concepto, nos dias 13-14, expressa-se até ao estroma esponjoso, glândulas profundas, miométrio e células imunitárias uterinas residentes, até os dias 15-16 (Johnson *et al.*, 1999; Austin *et al.*, 2004, citados por Spencer, Forde & Lonergan, 2015). À medida que a secreção de IFNT diminui, a expressão de ISG no estroma e epitélio glandular também diminui, mas mantém-se até os dias 18-20 de gestação (Spencer, Forde & Lonergan, 2015).

Segundo Antoniazzi *et al.* (2013), o mRNA e a proteína ISG15, no CL de ovinos, encontram-se predominantemente nas células lúteas grandes (LLC), a partir do dia 15 da gestação. Verificaram também que ocorre uma indução do mRNA de ISG15 por IFNT recombinante, independentemente da dose administrada e do local de administração (veia uterina ou jugular), com níveis similares no CL ipsilateral e contralateral, o que leva a crer que há libertação sistémica e endócrina de IFNT. Esta última visa o CL, protegendo-o contra o declínio da  $P_4$  induzido pela  $PGF_{2\alpha}$ .

O gene CXCL10 (membro da família da quimiocina CXC), também ISG, regula múltiplos aspetos da resposta inflamatória e imunitária por sua atividade quimiotática sobre os leucócitos (Spencer, Forde & Lonergan, 2015). Melhora a capacidade de fixação dos trofoblastos e inibe a expressão de OTR, regulando a produção de prostaglandinas pelo endométrio. A expressão do mRNA encontra-se aumentada no endométrio bovino nos dias 15 e 18 da gestação (Sakumoto *et al.*, 2017).

O IFNT não tem capacidade de induzir a expressão do complexo maior de histocompatibilidade e da macroglobulina- $\beta_2$ , ambos ISG clássicos, no epitélio luminal e glandular superficial, durante a gestação. Possivelmente trata-se de um mecanismo crítico que previne a rejeição imunitária do conceito, visto que o epitélio luminal está em contato com a trofoectoderme daquele (Choi *et al.*, 2013; Wiltbank *et al.*, 2016b).

A maioria dos ISG não clássicos exige a ativação prévia por  $P_4$  e dos PR. Nos ovinos e, possivelmente também nas vacas, englobam genes de transportadores de glucose e aminoácidos, genes envolvidos na proliferação, migração e ligação celular, proteases e seus inibidores e enzimas intracelulares no epitélio endometrial (Forde *et al.*, 2011; Bauersachs *et al.*, 2012; Spencer, Forde & Lonergan, 2015).

#### **2.1.2.1.2 IFNT e COX2**

Segundo Kim *et al.* (2003), o IFNT poderá estar envolvido no aumento da COX2 no início da gestação. Entre os dias 10 e 12, registou-se um incremento do mRNA e da proteína COX2, que se manteve elevado durante o início da gestação, em ovelhas. Nos bovinos, o IFNT regula positivamente a COX2 no endométrio, o que significa poder igualmente, estar envolvido na síntese de  $PGE_2$  endométrica (Spencer, Forde & Lonergan, 2015; Arosh *et al.*, 2016). Deste modo, independentemente da sua ação direta, o IFNT não inibe a expressão da COX2, que é uma enzima essencial para a síntese de prostaglandinas envolvidas na regulação do alongamento do conceito (Dorniak & Spencer, 2013). Assim sendo, acaba por promover indiretamente a estimulação da síntese de  $PGE_2$  endométrica, que exerce ações luteotróficas e provoca perda de sensibilidade lútea à  $PGF_{2\alpha}$  (Spencer, Forde & Lonergan, 2015; Arosh *et al.*, 2016; Wiltbank *et al.*, 2016b).

Outros autores, tais como, Sakumoto *et al.* (2017) concluíram o oposto, quando verificaram que o IFNT inibia a expressão da COX2 e do OTR em culturas de tecidos endométricos.



### **2.1.2.1.3 IFNT e células do sistema imunitário**

O IFNT regula positivamente a população de polimorfonucleares (PMN) durante o início da gestação, por estimulação do mRNA da IL8 (quimiotático de PMN), nas células lúteas (Shirasuna *et al.*, 2015). Os neutrófilos assumem múltiplas funções dentro do CL, tais como, desenvolvimento do tecido lúteo, angiogénese e luteólise (Jiemtaweeboon *et al.*, 2011). Shimizu *et al.* (2012) observaram que tanto os PMN como a IL8 aumentavam *in vitro* a secreção de P<sub>4</sub> pelas células lúteas. Talbott *et al.* (2014) obtiveram resultados diferentes, apontando para a ausência de influência da IL8 na produção de P<sub>4</sub>.

Os macrófagos libertam citocinas e diferenciam-se em macrófagos M1 e M2, que têm diferentes funções e são responsáveis pela modulação da inflamação. Nas fêmeas gestantes há uma diminuição do mRNA de TNF $\alpha$ , o que significa que ocorre uma alteração qualitativa dos macrófagos no CL gravídico, promovendo a libertação de citocinas anti-inflamatórias, como por exemplo a PGE<sub>2</sub>. Deste modo, as características dos macrófagos irão depender do ambiente lúteo. O IFNT e o ISG15 regulam, potencialmente, a função lútea e neutrófila (Shirasuna *et al.*, 2015).

### **2.1.2.2 Prostaglandinas**

Durante o início da gestação, o concepto e o endométrio produzem prostaglandinas (PG), tais como, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGI<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> (Ulbrich *et al.*, 2009; Spencer *et al.*, 2013; Spencer, Forde & Lonergan, 2015). Estas estão envolvidas na regulação da expressão de determinados genes (Spencer *et al.*, 2013).

Quando são produzidas *in vitro* pelo blastocisto, entre os dias 13 e 19 (Shelton *et al.*, 1990), e *in vivo*, entre os dias 15 e 18 (Ulbrich *et al.*, 2009), são responsáveis pelo desenvolvimento do concepto, eclosão da zona plúcida e alongamento. Tudo isso, torna-as essenciais à sobrevivência embrionária (Dorniak *et al.*, 2013; Spencer, Forde & Lonergan, 2015). Também regulam a expressão do VEGF e a sinalização da ANPT, que influenciam a permeabilidade vascular e a angiogénese uterina (Matsumoto *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003). Por isso, têm um efeito autócrino e endócrino (Ulbrich *et al.*, 2009; Dorniak & Spencer, 2013; Spencer, Forde & Lonergan, 2015).

Quando as PG são segregadas pelo endométrio, para além de estarem envolvidas na regulação da permeabilidade vascular, são essenciais para a implantação do concepto (Matsumoto *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2013; Brooks *et al.*, 2014; Spencer, Forde & Lonergan, 2015).

#### **2.1.2.2.1 PGE<sub>2</sub> como agente luteotrópico durante o reconhecimento materno da gestação**

Shelton *et al.* (1990) verificaram que a presença de um embrião no corno gravídico está associada a um aumento marcado de PGE<sub>2</sub> a partir do dia 12, sendo o dobro da concentração local do corno uterino contralateral. Nos dias 18-19, a concentração passa a

ser o triplo. Desta forma, a produção e conteúdo intra-uterino em  $PGE_2$  é substancialmente superior durante o início da gestação, relativamente ao que acontece ao longo do ciclo éstrico (Shelton *et al.*, 1990; Ulbrich *et al.*, 2009; Spencer, Forde & Lonergan, 2015).

Comparando o dia 16 de gestação com o mesmo dia do ciclo éstrico em ovelhas não gestantes, o rácio  $PGE_2/PGF_{2\alpha}$  é 72 vezes superior na veia útero-ovárica e 115 vezes maior na artéria ovárica. O que quer dizer, que o transporte de  $PGE_2$  do endométrio para o ovário é eficiente (Lee *et al.*, 2012; Arosh, Banu & McCracken, 2016; Wiltbank *et al.*, 2016b). Ou seja, a  $PGE_2$  é preferencialmente transportada do útero para o ovário durante o estabelecimento da gestação. É importante ter em conta, que a concentração intra-uterina de  $PGF_{2\alpha}$  é superior à de  $PGE_2$  no dia 16 do ciclo éstrico não gestacional e também da gestação. O que acontece é que durante a gestação só cerca de 35% da  $PGF_{2\alpha}$  é transportada para a veia uterina (Lee *et al.*, 2012; Arosh, Banu & McCracken, 2016). Assim, durante o reconhecimento materno da gestação, em vez de a  $PGF_{2\alpha}$  ser transportada para a veia uterina é, maioritariamente, transportada do endométrio para o lúmen uterino, tal como foi proposto para os suínos por Bazer & Thatcher (1997), citados por Arosh, Banu & McCracken (2016). Lukaszewska & Hansel (1980) também enunciaram a hipótese de a concentração de  $PGF_{2\alpha}$  sofrer um efeito de diluição por aumento do fluxo sanguíneo no corno uterino grávidico.

Existe um mecanismo de transporte celular para as PG (PGT) no complexo útero-ovárico. O PGT é membro da família transportadora de aniões inorgânicos transmembranários solúveis. Ele suporta de forma competitiva o transporte da  $PGF_{2\alpha}$  e da  $PGE_2$  (Banu *et al.*, 2003; Arosh, Banu & McCracken, 2016).

Vários estudos demonstraram que infusões intra-uterinas e intra-ováricas de  $PGE_2$ , em ovelhas não gestantes, aumentavam o intervalo interéstrico e diminuam a sensibilidade lútea à  $PGF_{2\alpha}$  endógena e exógena (Magness *et al.*, 1981; Reynolds *et al.*, 1983, citados por Arosh, Banu & McCracken, 2016).

A  $PGE_2$  também estimula *in vitro*, a síntese de  $P_4$ , em culturas de células lúteas dispersas (Shelton *et al.*, 1990). Assim, pode concluir-se que muito provavelmente a  $PGE_2$  é um dos fatores que protege o CL da luteólise durante o reconhecimento materno da gestação, bem como o seu estabelecimento, nos ruminantes (Arosh, Banu & McCracken, 2016).

#### **2.1.2.2.2 Síntese e vias de sinalização da $PGE_2$**

A  $PGE_2$  é sintetizada a partir da prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ) por ação da prostaglandina E sintetase (PGES1, PGES2 e PGES3). A PGES1 encontra-se acoplada à COX2 e é responsável pela síntese de cerca de 90% da  $PGE_2$ . As funções biológicas da  $PGE_2$  são exercidas através dos seus recetores (EP1, EP2, EP3, EP4), acoplados à proteína G, que ativa várias cascatas de sinalização (Narumiya *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2012; Arosh, Banu & McCracken, 2016). O EP2 e o EP4 ativam a adenilil ciclase. Esta gera AMPc que, por sua

vez, ativa a proteína quinase A (PKA). O EP1 atua de forma semelhante ao recetor da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , resultando na ativação da proteína quinase C (PKC). Por último, o EP3 que pode estar associado quer à indução, como à inibição de AMPc, aumenta os níveis de cálcio e  $\text{IP}_3$  intracelulares (Narumiya *et al.*, 1999; Arosh, Banu & McCracken, 2016).

#### **2.1.2.2.3 $\text{PGE}_2$ na manutenção lútea**

Entre os dias 12 e 16 da gestação, há um aumento do mRNA da prostaglandina 15 desidrogenase (PGDH) e da COX2 no CL, em comparação com o ciclo éstrico não gestacional, sugerindo que o CL gravídico tem maior capacidade de degradação das prostaglandinas endógenas resultantes do aumento da biossíntese de PG devido à elevação da regulação do COX2 (Silva *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2012; Arosh, Banu & McCracken, 2016). Isto poderá ser igualmente explicado pelo aumento do metabolito de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , entre os dias 14 e 16 (Arosh, Banu & McCracken, 2016). Ou seja, o CL gravídico tem maior capacidade de degradação da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e, por alteração dos rácios das enzimas responsáveis pela biossíntese das prostaglandinas, produz  $\text{PGE}_2$  (Silva *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2012; Antoniazzi *et al.*, 2013; Arosh, Banu & McCracken, 2016b). Este facto significa que passa a haver uma síntese preferencial de  $\text{PGE}_2$  em vez de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ao nível do CL (Antoniazzi *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que o IFNT aumenta a concentração da PGES1 endométrica. Há um aumento da secreção de  $\text{PGE}_2$  e supressão dos pulsos de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Desta forma, o IFNT estimula a biossíntese de  $\text{PGE}_2$  lútea, promovendo a resistência do CL à luteólise. Possivelmente, também interage com o EP2 e EP4 endométrico, através de um mecanismo agudo, precoce e indireto (Antoniazzi *et al.*, 2013; Arosh, Banu & McCracken, 2016).

#### **2.1.3 Alterações vasculares**

Um estudo realizado por Beindorf *et al.* (2010) demonstrou que a estrutura vascular se mantém durante o reconhecimento materno da gestação, ou seja, não ocorre angiogénese. Contudo, a manutenção do CL está relacionada com a diminuição de vasos sanguíneos por unidade de área de tecido lúteo. Estas conclusões estão de acordo com os resultados obtidos por Scully *et al.* (2015). Estes autores verificaram que a área e o rácio de fluxo sanguíneo não acompanhavam o aumento da produção de  $\text{P}_4$ , que ocorre no princípio da gestação.

Observa-se uma diminuição das células endoteliais e, de forma acentuada, dos perícitos e das células musculares lisas, no CL gravídico. Não há alteração na expressão do VEGF, o que significa que há uma tendência para a estabilização dos vasos sanguíneos no início da gestação. Possivelmente, não é necessária a existência de vascularização com forte capacidade de contração. Desta forma, o CL protege-se da ação vasodilatadora inicial seguida de vasoconstrição crónica produzida pela  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , que resulta em regressão lútea (Beindorf *et al.* 2010).

Concluindo, a resistência lútea à  $\text{PGF}_{2\alpha}$  é obtida por indução de genes estimulados por IFNT (ISG), pela regulação negativa dos recetores da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , pela regulação positiva do EP2 e do EP4 (Arosh, Banu & McCracken, 2016), e pela prevenção da apoptose celular por aumento da expressão de genes de sobrevivência, tais como, Bcl-X (membro da família Bcl-2), quinase serina/treonina (AKT) e proteína inibidora de apoptose ligada a X (XIAP) (Antoniazzi *et al.*, 2013), possibilitando a manutenção do CL e, conseqüentemente, o estabelecimento da gestação.

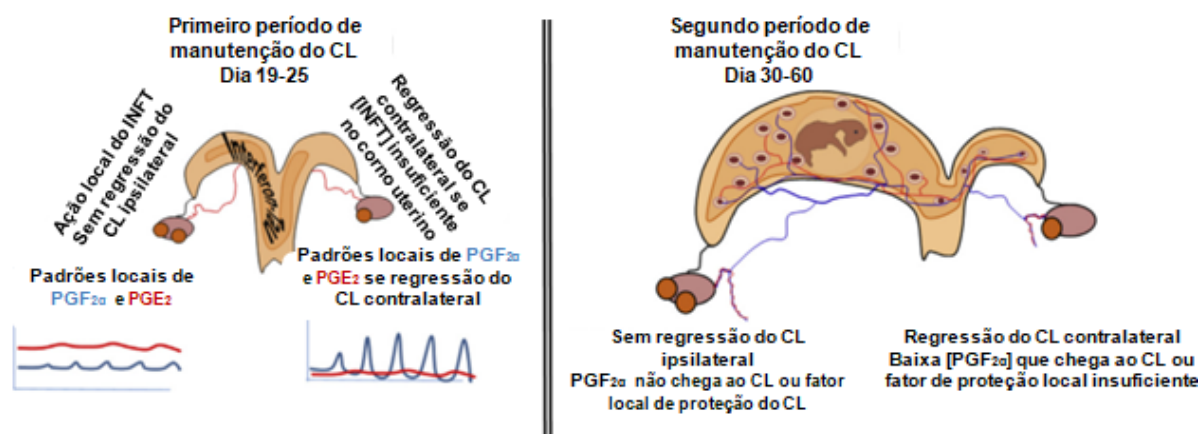
## **2.2 O corpo lúteo entre os dias 30 e 60 da gestação**

O pico de produção do IFNT pelo concepto ocorre no dia 23 da gestação, sendo que depois diminui dramaticamente nas semanas que se seguem (Godkin *et al.*, 1988; Stojkovic *et al.*, 1995; Wiltbank *et al.*, 2016b; Baez *et al.*, 2017). O ensaio destes últimos autores teve como objetivo determinar o *timing* da regressão de um CL acessório contralateral ao corno uterino grávidico, gerado no dia 5 da gestação. Eles verificaram que a maioria dos CL contralaterais regredia, não no período de reconhecimento materno da gestação (entre os dias 16 e 25), que seria o expectável, mas sim entre os dias 33 e 60. Os CL acessórios ipsilaterais ao corno uterino grávidico, raramente regrediam, quer entre os dias 16 e 25, quer entre os dias 33-60. Este tipo de registo também foi mencionado por Wiltbank *et al.* (2016b). Tendo em conta estes resultados, foi sugerido um segundo período distinto, entre os dias 30 e 60, em que teria que haver, de novo, uma estratégia de manutenção do CL para que a gestação possa progredir.

Os mecanismos envolvidos neste processo não foram ainda desvendados, mas os autores sugerem três hipóteses. A primeira é que a produção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  difere entre os dois cornos uterinos, sendo maior no corno uterino contralateral que no corno grávidico (Baez *et al.*, 2017). A segunda tem em conta o facto de haver um maior fluxo sanguíneo no corno uterino gestante que no contralateral, o que implica uma menor eficiência da transferência de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  da veia uterina para a artéria ovárica do lado em que ocorre a gestação (Forde & Chenault, 1981; Silvia & Ginther, 2009; Forde *et al.* 1979, citados por Wiltbank *et al.*, 2016b; Panarace *et al.*, 2006, citados por Baez *et al.*, 2017). Por último, terceira hipótese advoga que a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  chega aos dois ovários, mas a resposta das células lúteas a esta é menor no lado adjacente à gestação que no lado contrário (Baez *et al.*, 2017). Para estes autores, a segunda hipótese é a mais plausível (Figura 12). Esta também associada ao facto de os placentomas iniciarem a sua formação no corno uterino grávidico a partir do dia 30 de gestação, enquanto no corno contralateral o mesmo só acontece no dia 38 (Melton, Berry & Butler, 1951, citados por Baez *et al.* 2017). Segundo Silva & Ginther (2010), a menor vascularização endométrica no corno contralateral, reflete a diferença do *timing* de desenvolvimento dos placentomas, assim como a sua extensão nos dois cornos uterinos. Os placentomas no corno não grávidico são mais pequenos e podem ser detetados até ao

dia 60 de gestação (Curran *et al.*, 1986; Roberts, 1986, citados por Silva & Guinther, 2010). Esta discrepância entre os dois cornos uterinos contribui para um maior fluxo sanguíneo no corno grávidico justificando assim, a regressão do CL acessório contralateral e a manutenção do CL acessório ipsilateral, entre os dias 30 e 60 da gestação (Baez *et al.*, 2017).

Figura 12 – Modelos fisiológicos propostos para os mecanismos envolvidos na manutenção ou regressão do CL ipsilateral e contralateral durante os períodos cruciais da gestação, entre os dias 19-25 e dias 30-60 (adaptado de Baez *et al.*, 2017)



Em relação à vascularização do CL na altura da implantação embrionária, Beindorff *et al.* (2010), observaram uma regulação negativa do sistema ANPT-Tie, por diminuição da expressão do mRNA de Tie-2 nesta fase. Verificaram também que ocorria uma diminuição do rácio de ANPT2/ANPT1, o que indicava uma melhor estabilidade dos vasos sanguíneos. Assim sendo, não parecia haver necessidade de alterações vasculares no CL, pois os vasos sanguíneos lúteos encontravam-se na sua forma estável. Por último, verificaram um aumento do VEGF, que pensam estar associado a um aumento da permeabilidade vascular no dia 40, facto que otimiza o *uptake* de colesterol o que, consequentemente, melhora a função lútea.

### 2.3 Indução do parto por luteólise entre os dias 270 a 290 de gestação

O sinal que leva à indução do parto é produzido pelo feto. É o genoma fetal e os mecanismos ativados por eventos específicos do desenvolvimento fetal que determinam o fim da gestação (Jenkin & Young, 2004; Wiltbank *et al.*, 2016b). Após a maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-suprarrenal fetal, ocorre um aumento exponencial dos níveis de cortisol, nas últimas semanas da gestação de ovinos (Poore *et al.*, 1998; Wiltbank *et al.*, 2016b).

O pico de cortisol coincide com o declínio dos níveis plasmáticos de  $P_4$  e com a elevação dos níveis de  $E_2$ , provocados por uma alteração da via esteroidogénica placentária. Ocorre então um aumento das enzimas placentárias que promovem a produção de  $E_2$ , como a

P450c17, a  $3\beta$ -HSD e a P450arom (Nguyen *et al.*, 2012). Desta forma, vão ser despoletados uma série de eventos semelhantes aos que ocorrem na luteólise característica do fim do ciclo éstrico (Wiltbank *et al.*, 2016b). A elevação dos níveis de  $E_2$  leva à expressão de ER endométricos, que por sua vez, juntamente com o declínio dos níveis de  $P_4$ , induzem a expressão dos OTR. Estes, para além de estarem envolvidos na contratilidade uterina própria do parto, aumentam a secreção pulsátil de  $PGF_{2\alpha}$  que induz a luteólise (Wathes *et al.*, 1996; Wiltbank *et al.*, 2016b).

O cortisol fetal estimula a produção de  $PGE_2$ , por produção de  $PGH_2$  ao nível das células placentárias. Esta é importante na indução da P450arom, responsável pelo aumento da concentração de  $E_2$ . Assim, a elevação do cortisol associada ao aumento de  $E_2$ , conduz a um aumento da  $PGH_2$  endométrica, facto que promove a produção de  $PGF_{2\alpha}$ , que atinge o CL gravídico através da circulação sanguínea (Wiltbank *et al.*, 2016b).

### **3. MORTALIDADE EMBRIO-FETAL POR SUBFUNÇÃO LÚTEA**

A mortalidade embrio-fetal constitui uma fonte de perda económica para os produtores. Esta inclui não só a perda da descendência, mas também o aumento do intervalo entre partos, que por sua vez, contribui para o aumento da taxa de refugo (Jonker, 2004; Ayad *et al.*, 2012). Em vacas leiteiras de moderada a elevada produção, a mortalidade embrio-fetal, é cerca de 40 a 60% (Santos *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2010; Ayad *et al.*, 2012).

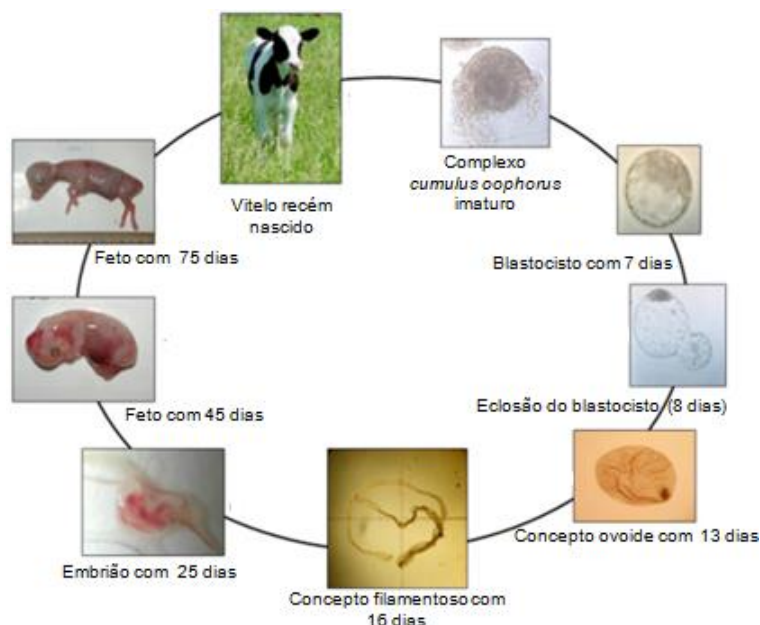
A fase mais crítica, quando ocorre o maior número de casos, é o período embrionário. Este compreende os primeiros 45 dias da gestação, ou seja, desde a fertilização até ao final da organogénese (Committee on Bovine Reproductive Nomenclature, 1972 citado por Santos *et al.*, 2004; Ayad *et al.*, 2012). A grande maioria da perda do conceito ocorre no período embrionário precoce, pois verifica-se um retorno ao cio, nos primeiros 25 dias após a fertilização. Neste caso, a perda embrionária ocorre no período de tempo equivalente à duração de um ciclo éstrico normal (Humblot, 2001; Ayad *et al.*, 2012). Esta fase inclui dois períodos críticos. O primeiro, entre os dias 5 e 8, quando se forma o blastocisto e, corresponde a 20-50% da mortalidade nas vacas leiteiras de alta produção (Berg *et al.*, 2010; Lonergan, Spencer & Forde, 2016a; Wiltbank *et al.*, 2016a). Segue-se então o período do alongamento do conceito e o reconhecimento materno da gestação, entre os dias 8 e 25, quando ocorrem 30% das perdas (Lonergan, Spencer & Forde, 2016a; Wiltbank *et al.*, 2016a).

O período embrionário tardio tem lugar entre os dias 25 e 45 da gestação, quando se verifica o processo de implantação, igualmente considerado um período crítico (Humblot, 2001; Dailey, Inskeep & Lewis, 2002 citados por Inskeep & Dailey, 2005; Ayad *et al.*, 2012). Nesta fase, a mortalidade embrionária é de 10 a 12% (Thatcher *et al.*, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1997; Inskeep, 2002 citados por Inskeep & Dailey, 2005; Inskeep, 2004 citado por Ayad *et al.*, 2012).

O período fetal estende-se dos dias 42-50 até o final da gestação (Committee on Bovine Reproductive Nomenclature, 1972 citado por Santos *et al.*, 2004). A taxa de mortalidade fetal é de 5-6%, mas pode atingir os 10% (Lopez-Gatius *et al.*, 2002; Jonker, 2004; Santos *et al.*, 2004).

A presença de níveis adequados de  $P_4$ , como já foi referido, é essencial para o crescimento e desenvolvimento do conceito. O seu efeito é mediado através do útero devido à regulação exercida sobre a função endométrica, o que permite as interações conceito-mãe, o reconhecimento da gestação e a receptividade uterina à implantação (Lonergan, 2011). Existem duas condições em que as vacas produzem menos  $P_4$ : quando o ciclo éstrico é de menor duração ou quando é de duração normal, mas com baixos níveis de  $P_4$  em circulação (Garverick, Zollers & Smith, 1992; Hommeida, Nakao & Kubota, 2004). A primeira situação é devida a um menor período de vida do CL, pois este vai regredir antes que o embrião tenha tempo de sinalizar a sua presença. A segunda situação leva a que o útero seja menos responsivo ao sinal de reconhecimento da gestação e mais sensível à libertação de  $PGF_{2\alpha}$  (Geary, 2005). A concentração de  $P_4$  em circulação é resultado da sua taxa de síntese pelo CL e da sua taxa de metabolização hepática. Ou seja, uma diminuição do nível de  $P_4$  reflete uma diminuição da sua produção e/ou aumento da sua metabolização (Inskeep & Dailey, 2005; Rhinehart *et al.*, 2009; Ayad *et al.*, 2012).

Figura 13 – Desenvolvimento embrio-fetal (adaptado de Lonergan, 2015)



### 3.1 Corpo lúteo e mortalidade embrionária precoce

Existem vários fatores associados à perda embrionária precoce que vão ter influência direta ou indireta sobre a função lútea. Como já foi referido, nas primeiras duas semanas de gestação, ocorrem uma série de processos chave, que se forem alvo de alguma anomalia, a

gestação ficará comprometida. Os de maior relevância registam-se na primeira semana após a inseminação, e são a fertilização, a ativação do genoma embrionário e a formação do blastocisto (Berg *et al.*, 2010; Wiltbank *et al.*, 2016a). Por último, é a capacidade de produção de INFT pela trofoectoderme, a partir do dia 8 até ao dia 25. O INFT bloqueia a luteólise garantindo a produção de níveis de progesterona adequados à manutenção da gestação (Wiltbank *et al.*, 2016a). Desta forma, a qualidade do oócito e do espermatozóide, o grau de maturação do folículo, a duração do pró-estro e a duração da fase lútea subsequente, vão ditar a possibilidade de ocorrência de gestação (Santos *et al.*, 2004). Portanto, a fertilidade nesta fase é fortemente influenciada pela ovulação de folículos imaturos ou não, o que está relacionado com duração da fase lútea e com as concentrações de progesterona do ciclo éstrico anterior (Starbuck, Dailey & Inskeep, 2004).

### **3.1.1 Persistência folicular**

A persistência folicular caracteriza-se por um aumento do crescimento folicular e do alongamento do seu período de dominância. Nesta situação, o desenvolvimento folicular ocorre num ambiente com uma concentração  $P_4$  subnormal, entre 1-2 ng/mL. Assim, esta baixa concentração de  $P_4$  permite o aumento da frequência da secreção pulsátil de LH, mas não o suficiente para a maturação final e ovulação do FPO, conduzindo a uma persistência da fase de dominância folicular com aumento dos níveis de  $E_2$  (Mihm *et al.*, 1994; Inskeep & Dailey, 2005; Salvio *et al.*, 1993 citados por Lonergan, 2011).

A quebra na fertilidade, neste caso, é devida a um aumento dos níveis de  $E_2$ , facto que provoca alterações intrafoliculares, no ambiente do oviduto e do útero, provocando a aceleração do transporte do embrião e, predispõem à mortalidade embrionária precoce. As alterações intrafoliculares afetam também o oócito tornando a fertilização impossível ou perturbando o desenvolvimento embrionário inicial, nomeadamente na altura da ativação do seu genoma. Por último, o aumento lento e gradual da frequência da libertação pulsátil de LH dissocia a ovulação do reinício da meiose, com rutura precoce da vesícula germinativa, resultando num oócito envelhecido (Mihm *et al.*, 1994; Inskeep & Dailey, 2005; Santos, Bisinotto & Ribeiro, 2016; Wiltbank *et al.*, 2016a). O CL originado a partir de um folículo persistente tem dimensões e capacidade de síntese de  $P_4$  normais (Mihm *et al.*, 1994).

As vacas de alta produção têm um índice elevado de degenerescência embrionária, durante a primeira semana (Wiltbank *et al.*, 2016a). A elevada capacidade de produção está associada a uma maior taxa de metabolização de  $P_4$ , diminuindo a sua concentração em circulação. É de esperar que as vacas em lactação tenham maior taxa de ovulação de folículos persistentes que as novilhas (Lucy, 2001; Cooperative Regional Research, 1996 citado por Inskeep & Dailey, 2005). Da mesma forma, tratamentos prolongados de sincronização de cio com progestagénios ou aqueles iniciados na altura em que ocorre a



luteólise espontânea, potencializam o aparecimento de folículos persistentes (Mihm *et al.*, 1994).

### **3.1.2 Duração do pró-estro e função lútea subsequente**

A maturação folicular é determinada pelo efeito cumulativo de fatores, que incluem a duração do pró-estro, quantidade de  $E_2$  produzida, diâmetro e idade folicular. Foi demonstrado que a duração do pró-estro define com maior precisão o grau de maturação folicular, pois influencia a fertilidade independentemente da idade e do tamanho folicular (Mussard, 2009; Bridges *et al.*, 2010). O pró-estro corresponde ao período de tempo entre a luteólise e a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH, que marca a entrada na fase do estro. Esta fase está associada a um aumento progressivo dos níveis de estradiol, crescimento e maturação folicular pré-ovulatória e a alterações no trato reprodutivo provocadas pelo  $E_2$  (Dickinson *et al.*, 2016).

Assim, uma redução temporal do pró-estro leva a menores níveis de  $E_2$  pré-ovulatórios, menores concentrações de  $P_4$  e a uma quebra da taxa de gestação (Bridges *et al.*, 2010). Portanto, a manipulação da duração do pró-estro provoca alterações na concentração lútea de  $P_4$  (Mussard, 2009). Segundo Vasconcelos *et al.* (2001), a ovulação de um folículo dominante de menores dimensões está associada a uma menor fertilidade, devido a uma diminuição posterior da concentração de  $P_4$  em circulação e/ou indução precoce dos mecanismos de luteólise, que dão origem a um CL de curta duração (Mussard, 2009; Bridges *et al.*, 2010). Peters & Pursley (2003) chegaram à mesma conclusão quando verificaram que a administração de GnRH até 24 horas após a  $PGF_{2\alpha}$  reduzia a taxa de gestação após IA, por redução do tempo de vida do CL. Menores níveis circulantes de  $E_2$  durante a ovulação predispõem ao aparecimento de um CL de curta duração, pois aqueles não são suficientes para provocar a regulação negativa dos OTR, podendo potencializar a liberação precoce de  $PGF_{2\alpha}$  endométrica (Mann & Lamming, 2000). Poderá ainda ter implicações na secreção de LH induzida pela GnRH, visto que aquela hormona é responsável pela sensibilização da hipófise à GnRH (Bridges *et al.*, 2010).

Um FPO de menores dimensões implica a ovulação de um oócito imaturo, concentrações de  $E_2$  diminuídas, o que acaba por ter influência negativa no ambiente do oviduto, afetando a capacitação dos espermatozoides e, por último, conduzindo à formação de um CL de menores dimensões, o que pode alterar a função lútea subsequente (Vasconcelos *et al.*, 2001; Peters & Pursley, 2003). Segundo o estudo realizado por Vernunft, Weitzel & Viergutz (2013) há uma correlação significativa entre o tamanho do FPO e as concentrações de  $E_2$  e  $P_4$  no fluido folicular, com o desenvolvimento e a morfologia do CL e concentração de  $P_4$ . Como as células lúteas têm origem nas células foliculares, os fatores que afetam a diferenciação e maturação folicular provavelmente influenciam a função lútea subsequente (Atkins *et al.*, 2013; Wiltbank *et al.*, 2014).

Concluindo, a ovulação prematura de um folículo implica uma diminuição da capacidade de fertilização, menor capacidade do desenvolvimento do embrião até a fase de blastocisto, atraso ou função lútea inadequada e/ou regressão lútea prematura (Inskeep & Dailey, 2005).

### **3.1.3 Progesterona e ambiente tubário e uterino**

A  $P_4$  é responsável por tornar o ambiente uterino adequado ao desenvolvimento embrionário e à sua implantação (Garvenick, Zollers & Smith, 1992; Clemente *et al.*, 2009; Lonergan, 2015; Lonergan, Forde & Spencer, 2016b). Até à eclosão do blastocisto, entre os dias 8 e 9, o embrião não depende do contato direto com aparelho reprodutivo feminino para beneficiar das alterações induzidas pela  $P_4$  no ambiente uterino (Clemente *et al.*, 2009; Lonergan, 2015; Lonergan, Forde & Spencer, 2016b). Apesar disso, demonstrou-se que embriões fertilizados *in vitro* e cultivados num oviduto, têm melhor qualidade avaliada em termos de morfologia, expressão génica, criotolerância e, revelam ainda, melhor taxa de gestação, após transferência. A  $P_4$  também influencia o ambiente do oviduto, por exemplo, através da alteração da concentração de aminoácidos, mas ainda não há informação suficiente referente à possibilidade de comunicação entre o embrião e o oviduto (Lonergan, 2015; Lonergan, Spencer & Forde, 2016b). A partir do dia 12-14, dá-se o início da fase de alongamento que é totalmente dependente das secreções uterinas. Estas estimulam e medeiam o crescimento do conceito e sua diferenciação no início da gestação (Lonergan, 2015; Lonergan *et al.*, 2016; Lonergan, Forde & Spencer, 2016b).

A  $P_4$  promove as alterações temporais e espaciais do transcriptoma do epitélio luminal e glandular endométrico, que posteriormente é estimulado pelo INFT e pelas prostaglandinas, conduzindo a alterações específicas no histotrofo e no estabelecimento da receptividade uterina (Santos *et al.*, 2004; Lonergan *et al.*, 2016). A disponibilidade de  $P_4$  no início do diestro beneficia a taxa de concepção e de sobrevivência embrionária (Santos *et al.*, 2004). O aumento da  $P_4$  após a ovulação é essencial, pois mantém a sincronia entre o embrião em desenvolvimento e o útero (Ayad *et al.*, 2012).

Num estudo realizado por Forde *et al.* (2012) verificou-se que a expressão de genes do epitélio endométrico, em especial os que têm uma ação biológica no alongamento do conceito, encontra-se diminuída no dia 13, num grupo de fêmeas induzido a ter concentrações subnormais de  $P_4$  durante a fase lútea, facto que parece reflectir um atraso das alterações temporais normais que ocorrem na expressão génica endométrica (Forde *et al.*, 2011). A expressão coordenada destes genes está associada à presença (dia 7) e à perda (dia 13) dos recetores de  $P_4$  no epitélio endométrico luminal e glandular. Como a expressão génica está diminuída no dia 7 e aumenta consideravelmente no dia 13, esta situação caracteriza as alterações no transcriptoma do endométrio entre a fase de blastocisto e o início do processo de alongamento. Um atraso no aumento de  $P_4$  após a ovulação leva um retardamento das alterações do transcriptoma endométrico que, por sua

vez, reduz a capacidade de manter o processo de alongamento do concepto (Forde *et al.*, 2011, 2012).

#### **3.1.4 Reconhecimento materno da gestação (manutenção do corpo lúteo)**

O diálogo entre o concepto e o endométrio materno é essencial para uma gestação bem-sucedida. O INFT, produzido pelas células mononucleares da trofoectoderme do concepto, é o sinal responsável pelo estabelecimento da gestação (Thatcher *et al.*, 2001). A partir do dia 12 após a IA, foi demonstrada a expressão génica do INFT no concepto. O pico da sua expressão é coincidente com a fase do reconhecimento materno da gestação (dia 16), continuando a ser detetada até o dia 25 (Farin *et al.*, 1990). A sua ação principal é o bloqueio do início do mecanismo da luteólise, por supressão da secreção pulsátil de PGF<sub>2α</sub> endométrica, permitindo que o CL continue ativo na produção de P<sub>4</sub> (Thatcher *et al.*, 2001).

Um bom desenvolvimento do concepto permite a secreção de quantidades de INFT suficientes para que a luteólise seja impedida. Ou seja, um embrião de fraca qualidade, com um atraso no seu desenvolvimento ou que morra, condiciona a quantidade de INFT produzida (Santos *et al.*, 2004; Wijma *et al.*, 2016). Tal foi verificado pela menor abundância de mRNA de genes estimulados pelo INF (ISG), no dia 22 após a IA, em vacas que experienciaram morte embrionária, quando comparadas com as gestantes (Wijma *et al.*, 2016). Os diferentes perfis de P<sub>4</sub>, antes e após ovulação, resultam em diferentes fases de desenvolvimento do concepto. Os estádios mais precoces corresponderam a níveis de INFT, no fluido intrauterino, inferiores aos de conceptos mais desenvolvidos, ao 15º dia após a IA (Ribeiro *et al.* 2016).

Desta forma, parte das perdas embrionárias precoces podem ser devidas a uma deficiente síntese de agentes luteotrópicos embrionários, ou por incapacidade de resposta do CL a estes mesmos agentes (Thatcher *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004).

#### **3.2 Corpo lúteo e mortalidade embrionária tardia e fetal precoce**

O período embrionário tardio e fetal precoce compreende o segundo mês gestacional. Nesta fase, ocorre uma série de eventos cruciais para o desenvolvimento adequado do concepto. Deficiências na placentação, na transição da nutrição amniótica para alantóica, alterações na vascularização da placenta e de outros sistemas ou subdesenvolvimento do embrião/feto podem, então, levar à interrupção da gestação (Wiltbank *et al.*, 2016a).

A P<sub>4</sub>, após o reconhecimento materno, regula indiretamente a secreção do histotrofo, a estimulação do endométrio, a implantação, a placentação e, consequentemente, a sobrevivência do embrião/feto (Kenyon *et al.*, 2013).

A placentação é um ponto crítico na gestação. Qualquer anomalia no processo pode levar a um desenvolvimento inadequado do embrião e potenciar a perda gestacional. Segundo Aires *et al.* (2014), a placentação tem início no dia 28 com a formação de projeções

carunculares uterinas e envolve uma extensa hipertrofia do endométrio que continua até o dia 60.

Apesar de ocorrer a regulação negativa de PR no epitélio luminal e glandular endométrico e de esta ser um pré-requisito para que a implantação ocorra, os recetores permanecem nas células do estroma uterino e no miométrio (Bazer *et al.*, 2009; Forde *et al.*, 2011, 2012). A indução de PR no estroma uterino estimula a secreção de fatores de crescimento, designados no seu conjunto por progestamedinas, que incluem o fator de crescimento fibroblástico 7 (FGF-7) e 10 (FGF-10) e fator de crescimento hepatocitário (HGF) (Bazer *et al.*, 2009). No miométrio, a sua função é promover a quiescência do útero para evitar a expulsão dos conteúdos uterinos durante a gestação (Boos *et al.*, 2006 citados por Giordano *et al.*, 2012).

As situações que aumentam o risco de perda da gestação são a aciclia durante o período voluntário de espera (Santos *et al.*, 2004), a diminuição da P<sub>4</sub> durante o crescimento do folículo dominante (Mihm *et al.*, 1994; Inskeep & Dailey, 2005; Wiltbank *et al.*, 2014), a paridade (Santos *et al.*, 2009 citados por Wiltbank *et al.*, 2016a), as doenças uterinas e não uterinas (mamites), a deficiência em tocoferol durante o período seco (Bittar *et al.*, 2014; Fuenzalida *et al.*, 2015; Pontes *et al.*, 2015 citados por Wiltbank *et al.*, 2016a) ou a ausência de expressão de cio no período pré-ovulatório (Santos *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 2005; Giordano *et al.*, 2016; Wiltbank *et al.*, 2016a).

A questão que ainda permanece por esclarecer é se a perda da gestação nesta fase resulta da morte do embrião e regressão lútea subsequente ou se é a regressão do CL que leva à morte embrionária (Giordano *et al.*, 2012; Wiltbank *et al.*, 2016a).

### **3.2.1 Maturidade folicular**

Segundo Perry *et al.* (2005), a morte embrionária tardia/fetal precoce é influenciada pelo tamanho do folículo quando a ovulação é induzida. Vacas induzidas a ovular folículos de diâmetro igual ou inferior a 13,2 mm revelaram menor concentração de P<sub>4</sub> e um atraso no aumento do seu valor, após a ovulação. Dickinson *et al.* (2016) verificaram que a indução da ovulação de folículos com menos de 11,3 mm de diâmetro diminuía a taxa de gestação e aumentava a taxa de mortalidade embrionária tardia. Em ambos os estudos, não houve influência do tamanho folicular quando a ovulação foi espontânea. A ovulação de folículos imaturos tem repercussões entre os dias 27 e 70, devido à ovulação de um oócito menos competente, a formação de um CL subfuncional e, consequentemente, a uma preparação inadequada do ambiente uterino (Vasconcelos *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 2005; Atkins *et al.*, 2013; Dickinson *et al.*, 2016).

### **3.2.2 Concentração de P<sub>4</sub> e mortalidade embrionária tardia/fetal precoce**

López-Gatius *et al.* (2002) sugeriram que o CL pode revelar uma baixa taxa de secreção de P<sub>4</sub> durante o período embrionário tardio e fetal precoce e que isso poderia ser causa de

perda da gestação nesta fase. Existe uma correlação negativa entre a concentração periférica de  $P_4$  e a mortalidade embrionária tardia (Gábor *et al.*, 2008). A concentração de  $P_4$  no dia 14 tende a estar associada à manutenção da gestação entre os dias 28 e 60. Quando a sua concentração é igual ou superior a 5 ng/mL há uma redução de perdas entre os dias 28 e 63 (Kenyon *et al.*, 2013). O que significa que a  $P_4$  exerce um efeito positivo na adesão e placentação, provavelmente devido à sua ação indireta sobre o desenvolvimento embrionário, por modulação do ambiente uterino e secreção de histotrofo (Starbuck, Dailey & Inskeep, 2004; Kenyon *et al.*, 2013; Lonergan, Forde & Spencer, 2016b). Starbuck, Dailey & Inskeep (2004) observaram que a manutenção da gestação entre as semanas 7 e 9 estava relacionada com os níveis de  $P_4$  durante a semana 5. Rhinehart *et al.* (2009) verificaram que a diminuição da concentração da  $P_4$ , após dia 29, em vacas de carne, promoveu a morte embrionária. Os mesmos autores registaram mais perdas de gestação durante o período embrionário tardio que no período fetal precoce.

Porém, outros autores não encontraram uma relação entre a concentração de  $P_4$  e a mortalidade ou capacidade de sobrevivência embrionárias (Breukelman *et al.*, 2012; Pohler *et al.* 2013; Pohler *et al.* 2016).

### 3.2.3 Placentação

Pouco se sabe sobre as causas exatas da mortalidade embrionária tardia e fetal precoce, mas ao acontecerem entre os dias 25-30 a 60 da gestação, poderão ser, provavelmente, devidas a uma insuficiência placentária (Pohler *et al.*, 2013; Pohler *et al.*, 2016).

Para que uma placentação sinepiteliocorial seja bem sucedida tem que ocorrer a formação de um sincício na interface materno-fetal, normalmente entre os dias 20 e 26, que consiste na fusão das células binucleadas trofoblásticas do alantocórion com as células epiteliais luminais endométricas, sem que haja invasão do estroma caruncular e do endométrio intercaruncular pelo trofoblasto (Bazer *et al.*, 2009; Aires *et al.*, 2014). A placentação tem início no dia 28 e é marcada pela formação de projeções carunculares, envolvendo uma hipertrofia extensa do endométrio, que se mantém até dia 60 (Aires *et al.*, 2014). Mais tarde, dá-se a fixação das membranas cório-alantóicas da placenta com as membranas carunculares do útero materno desprovidas de glândulas, induzindo o desenvolvimento dos cotilédones placentários. Forma-se assim o placentoma, que é a unidade funcional e estrutural da placenta dos ruminantes, cuja função é mediar as trocas gasosas, de nutrientes e de resíduos metabólicos (Bazer *et al.*, 2009; Aires *et al.*, 2014). Todo este processo exige uma remodelação tecidual extensa, que inclui o tecido vascular para que haja um suprimento sanguíneo adequado ao desenvolvimento embrio-fetal (Aires *et al.*, 2014).

As mucinas transmembranares existentes na membrana apical das células epiteliais têm propriedades anti-adesivas que são um obstáculo à implantação do conceito e, conseqüentemente, à placentação. Durante o período de peri-implantação, a sua presença é

reduzida devido à ativação de determinadas proteases e por perda de recetores de  $P_4$  nas células epiteliais e glandulares do endométrio. Desta forma, ficam expostas as moléculas de adesão e de fixação que permitem a aposição inicial (Bazer *et al.*, 2009).

Perry *et al.* (2005) observaram uma tendência para haver menor concentração de glicoproteínas associadas à gestação (PAGs) em vacas que experienciaram morte fetal. Visto aquelas serem maioritariamente segregadas por células binucleares trofoblásticas, podem ser um indicador de anomalia no desenvolvimento da placenta, por um ambiente uterino inadequado e/ou fraco desenvolvimento embrionário. O mesmo se verificou quando Pohler *et al.*, (2013) observaram que vacas que registaram mortalidade embrionária tardia e fetal precoce exibiram uma menor concentração de PAGs no dia 28, que as vacas que mantiveram a gestação (Pohler *et al.*, 2016).

### **3.2.3.1 Placentação e o segundo estímulo para a manutenção da gestação**

A secreção de  $PGF_{2\alpha}$  mantém-se ao longo de toda a gestação e é relativamente constante entre os dias 31 e 35, em oposição à libertação pulsátil que resulta em luteólise (Wiltbank *et al.*, 2016b). Tal facto sugere que a secreção de  $PGF_{2\alpha}$  pelo endométrio e/ou embrião pode ser benéfica para a manutenção da gestação, desde que o seu nível não ultrapasse determinado limite (Bridges *et al.*, 2000). Assim, surge a questão de como é que a  $PGF_{2\alpha}$  afeta, aparentemente, o CL acessório contralateral e não o gestacional ou acessório ipsilateral ao corno uterino grávidico (Bridges *et al.*, 2000; Wiltbank *et al.*, 2016a; Baez *et al.*, 2017).

Brigdes *et al.* (2000) sugeriram a existência da produção, com origem embrionária, de um segundo estímulo durante o segundo mês de gestação para a sua manutenção, quando verificaram que indução com hCG de um CL de substituição só tinha capacidade de manter a gestação se ocorresse no ovário ipsilateral ao corno grávidico e com maior taxa de sucesso quando induzido após dia 36. Uma menor competência do CL no dia 7 pode afetar negativamente a secreção deste segundo sinal e a sobrevivência embrionária após o reconhecimento materno da gestação (Chagas e Silva *et al.*, 2002). Posteriormente, Baez *et al.* (2017) propuseram a existência de um segundo mecanismo responsável pela manutenção da gestação, relacionado com a diferença de vascularização entre o corno uterino grávidico e o corno contralateral e, por isso, com a placentação. Entre os dias 22 e 60 há uma maior vascularização e um maior desenvolvimento dos placentomas no corno uterino grávidico, o que implica um maior fluxo sanguíneo local que dificulta a passagem da  $PGF_{2\alpha}$  da veia uterina para a artéria ovárica (Silvia & Ginther, 2009, Wiltbank *et al.*, 2016b, Baez *et al.*, 2017).

Por seu turno, se os níveis de  $P_4$  não forem os adequados, quer por aumento da sua catabolização quer por diminuição da sua produção, o ambiente uterino poderá não ser favorável à placentação, o que conduziria à morte embrio-fetal (Starbuck, Dailey & Inskeep,

2004). Pelo contrário, se a placentação for deficiente por outras causas pode levar a uma subfunção lútea ou até mesmo à luteólise, pois a vascularização do corno uterino gravídico está diminuída, ou seja, a passagem de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  está facilitada, não permitindo que a gestação se mantenha (Baez *et al.*, 2017).

### **3.3 Regressão lútea ou morte do embrião como causa de perda da gestação?**

Giordano *et al.* (2012) estudaram os efeitos que a morte embrionária induzida no dia 39, por luteólise através da administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ou por infusão intrauterina de uma solução salina hipertónica, teriam nas concentrações de  $\text{P}_4$  e PAGs. Verificaram que o período de tempo entre o tratamento e o desaparecimento do conceito do útero foi mais curto no grupo tratado com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  que no da infusão da solução hipertónica. O mesmo foi verificado anteriormente por Kastelic, Northey & Guinther (1990). O lapso temporal para a expulsão embrionária foi consistente entre as vacas do grupo  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , e o mesmo não se verificou quando foi utilizada a solução hipertónica. As concentrações de  $\text{P}_4$  variaram consoante o tratamento aplicado. Diminuíram drasticamente no tratamento com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e, quando foi utilizada a solução hipertónica, as concentrações mantiveram-se semelhantes às do grupo controlo (vacas gestantes) durante 7,5 a 9,5 dias. Basicamente, a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  despoleta um mecanismo que resulta numa disfunção da interface materno-fetal, pois a diminuição da concentração de  $\text{P}_4$  daí resultante não afetou severamente o embrião, mas resultou na sua expulsão juntamente com as estruturas membranares anexas. Neste caso, em algumas das vacas só foi detetada a paragem cardíaca do embrião poucas horas antes da sua expulsão. Após cerca de 30 minutos da administração da solução hipertónica observou-se a paragem cardíaca embrionária, mais tarde seguida de alterações significativas no embrião, membranas e fluido uterino. Neste grupo, a regressão lútea foi tardia ou ausente, pois não foram observadas alterações significativas no tamanho e aparência do CL após o tratamento (Kastelic, Northey & Guinther, 1990).

Pohler *et al.* (2013) concluíram que a mortalidade embrionária, entre os dias 31 e 59, era devida a deficiência placentária ou embrio-fetal, em vez de lútea, pois verificaram que a concentração de PAGs diminuía antes ou ao mesmo tempo que a concentração de  $\text{P}_4$ . Noutros estudos, apesar de a morte embrionária preceder a regressão lútea, as vacas com menores níveis de  $\text{P}_4$ , após o reconhecimento materno da gestação e durante a placentação, mantiveram um menor número de gestações. (Starbuck, Dailey & Inskeep, 2004; Inskeep & Dailey, 2005).

### **3.4 Subfunção lútea ou maior metabolização de progesterona?**

As concentrações de  $\text{P}_4$  durante o ciclo éstrico e a gestação são o resultado da capacidade da sua produção pelo CL e da sua taxa de metabolização hepática. Ou seja, baixas concentrações de  $\text{P}_4$  podem ser atribuídas ao CL, por via de uma acção luteolítica ou anti-luteotrófica, ou por diminuição da capacidade esteroideogénica das células lúteas ou ainda,

por um menor número de células lúteas grandes (LLC) (Wiltbank *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 2014). Por outro lado, os níveis de  $P_4$  também estão associados ao nível de produção da vaca de leite (Wiltbank *et al.*, 2006; Rhinerhart *et al.*, 2009). Foi demonstrado que há um aumento da taxa de metabolização de  $E_2$  e da  $P_4$  em resposta à ingestão de alimentos, provavelmente relacionada com um aumento do fluxo sanguíneo hepático (Lucy, 2001; Sangsritavong *et al.*, 2002; Wiltbank *et al.*, 2006; Rhinerhart *et al.*, 2009). Nas vacas leiteiras, a aplicação de um plano nutricional elevado e contínuo repercute-se numa elevação crónica do fluxo sanguíneo hepático e na taxa de metabolização de hormonas esteróides (Lucy, 2001; Sansritavong *et al.*, 2002).

Moore *et al.* (2014) concluíram que as concentrações sub-normais de  $P_4$  são apontadas como a maior causa de diminuição da fertilidade de vacas leiteiras em produção. O seu estudo debruçou-se sobre os fatores que afetam as concentrações de  $P_4$ . Para tal, foram selecionadas vacas com o mérito genético semelhante para a produção de leite, mas com o valor genético para a fertilidade, elevado (Fert+) ou reduzido (Fert-). Verificaram que as vacas Fert+ tinham concentrações de  $P_4$  em circulação mais elevadas que as Fert-, devido a diferenças no volume lúteo, mas não na *clearance* da  $P_4$ . Por outro lado, as fases lúteas anormais, longas ou curtas, estão relacionadas com a saúde no peri-parto e com o estado de nutrição da vaca (Lucy, 2001). Deste modo, a perda gestacional poderá estar relacionada com uma menor capacidade de secreção de  $P_4$  pelo CL, durante o período embrionário tardio e fetal precoce (Lopez-Gátius *et al.*, 2002).

Outros autores afirmam que fatores metabólicos sistémicos afetam mais a concentração periférica de  $P_4$  que o fluxo sanguíneo ovárico ou a produção lútea de  $P_4$  (Rhinehart *et al.*, 2009; Wiltbank *et al.*, 2014). Uma taxa de metabolização mais elevada das hormonas esteróides acaba por ter repercussões não só nas suas concentrações em circulação, mas também no tamanho folicular e lúteo (Wiltbank *et al.*, 2006). Não obstante, é possível selecionar vacas de forma a melhorar as concentrações de  $P_4$  sem contrariar a capacidade de produção de leite (Moore *et al.*, 2014; Wiltbank *et al.*, 2014).



## PARTE II – ENSAIO EXPERIMENTAL

### 1. Introdução

Nos últimos anos a ultrassonografia em modo bidimensional (modo B), que decorre em tempo-real, tem sido utilizada no âmbito da reprodução animal para o estudo de eventos fisiológicos básicos e alterações morfológicas, particularmente aqueles envolvidos na dinâmica ovárica (folículos e estruturas lúteas). A sua utilização permitiu a melhor compreensão do recrutamento, desenvolvimento e dominância folicular, dos padrões das ondas foliculares e do desenvolvimento do CL (Siqueira *et al.*, 2009). Desta forma, foi possível o estabelecimento de protocolos efetivos de sincronização de estro/ovulação e de superovulação (Pursley *et al.*, 1995; Bo *et al.*, 2008 citados por Siqueira *et al.*, 2009). Possibilitou ainda, a avaliação sequencial do tamanho (área), forma e consistência do CL (Kastelic, Bergfelt & Ginther, 1990; Hansen *et al.*, 2000; Siqueira *et al.*, 2009). A ultrassonografia tem, pois, várias aplicações práticas no controlo reprodutivo de um efetivo, como sejam, o diagnóstico de gestação, a identificação de gestações gemelares, a sexagem fetal e o diagnóstico da mortalidade embrio-fetal (Fricke & Lamb, 2005; Quintela *et al.*, 2012).

A eficiência e a precocidade do diagnóstico de gestação são essenciais para o sucesso do manejo reprodutivo, pois permite detetar, mais cedo, as fêmeas não gestantes e aplicar uma estratégia rápida e eficaz que leve à beneficiação desses animais, diminuindo o intervalo entre inseminações artificiais (IA) sucessivas e o número de dias em aberto (De Vries, Bartolome & Broaddus, 2005; Fricke & Lamb, 2005; Gaja *et al.*, 2013). Por outro lado, podem ocorrer falhas no diagnóstico de gestação entre os dias 21 e 26 após IA, devido à acumulação de fluidos intrauterinos característicos do pró-estro ou do estro, ou à acumulação de fluidos patológicos e, há ainda que referir o caso de fêmeas diagnosticadas como gestantes, mas que sofrem mortalidade embrionária precoce. A ecografia também é útil na monitorização do sucesso do programa reprodutivo, porque permite determinar a taxa de gestação e a sobrevivência embrionária (Fricke & Lamb *et al.*, 2005).

Demonstrou-se que as características ecográficas do CL, como o tamanho, volume e fluxo sanguíneo (com a utilização do Doppler de cor) se alteram de acordo com a capacidade funcional do CL, ou seja, com as concentrações sistémicas de P<sub>4</sub> (Kastelic, Bergfelt & Ginther, 1990; Hansen *et al.*, 2000; Herzog *et al.*, 2010; Lüttegenau *et al.*, 2011). Segundo vários autores, existe uma relação positiva entre o tamanho do CL e a sua capacidade de síntese de P<sub>4</sub> (Hanzen *et al.*, 2000; Vasconcelos *et al.*, 2001; Herzog *et al.*, 2010; Lüttegenau *et al.*, 2011; Gaja *et al.*, 2013). Os entraves são a dificuldade da diferenciação ecográfica entre um CL em desenvolvimento e um CL em regressão, o facto de o tecido lúteo na sua fase estática ter o mesmo tamanho que um CL em luteólise e, por último, a evidência da regressão lútea funcional preceder a estrutural (Hanzen *et al.*, 2000; Hergoz *et al.*, 2010).

Para revisão dos princípios básicos da ultrassonografia e sua aplicação prática no manejo reprodutivo bovino a autora sugere a consulta do trabalho realizado por Pereira (2013).

Os objetivos do presente estudo foram: a determinação da taxa de gestação e da mortalidade embrionária tardia e fetal precoce em vacas primíparas e multíparas da raça Frísia Holstein sujeitas a um protocolo de sincronização de ovulação para IA em tempo fixo (IATF); a pesquisa de uma possível relação entre as perdas gestacionais e as alterações na área do corpo lúteo em determinados períodos críticos; e, por último, o estudo da relação entre a área do folículo pré-ovulatório, a área do corpo lúteo subsequente e, por fim, a probabilidade de gestação.

## **2. Materiais e métodos**

O estudo realizou-se, entre 24 de Setembro de 2016 e 30 de Março de 2017, na Fonte Leite – Exploração Agrícola e Pecuária S.A., na Azambuja (Latitude N 39° 4' 5.9"; Longitude W 8° 53' 25.2"), que explora intensivamente bovinos leiteiros de raça Frísia Holstein, com a realização de três ordenhas por dia e com cerca de 800 vacas em lactação.

### **2.1 Animais em estudo**

Foram utilizadas no estudo todas as vacas primíparas e multíparas que responderam ao protocolo de sincronização *Presynch* e *Ovsynch* para IATF (o primeiro serviço pós-parto), entre os dias 29 de Setembro de 2016 e 26 de Janeiro de 2017. No total, foram acompanhadas 107 vacas a partir das 24 horas antes da IA e ao longo de determinados dias pós-IA (dias 7, 14, 19-21, 42 e 63). Foram excluídas do estudo as vacas em que o protocolo não funcionou, isto é, as que entraram em cio antes do protocolo terminar, as que contraíram mastites ou com claudicações, as que morreram e, por fim, as que foram objeto de erros técnicos, tais como, dificuldade na interpretação da imagem ecográfica e má recolha de dados. No final, a amostra reduziu-se a 69 animais (Tabela 2).

Tabela 2 – Vacas excluídas do estudo

<b>Nº inicial de vacas</b>	<b>107</b>
Nº total de vacas eliminadas do estudo:	38
- erros técnicos	18
- falhas no protocolo	11
- mastites	3
- claudicação	5
- morte	1
<b>Nº final de vacas (amostra)</b>	<b>69</b>

## 2.2 Desenho experimental

De início realizou-se a avaliação por palpação e ultrassonografia rectal do FPO no dia anterior à IA em tempo fixo (d -1) que, por norma, ocorria todas as quintas-feiras. Foi escolhido o dia anterior à inseminação de forma a minorar o *stress* da vaca no dia da IA, diminuir o risco de rutura do FPO e por questões de logística da exploração. Foram efetuadas (por ultrassonografia) e registadas, as medidas do diâmetro maior e menor, área e volume.

As vacas foram novamente examinadas para a avaliação do CL, da mesma forma que para o FPO, nos dias 7, 14, 19-21, 35, 42 e 63 após a IA. O diagnóstico de gestação (DG) realizou-se ao dia 35. Nos dias 42 e 63 deu-se seguimento à avaliação da viabilidade fetal, por verificação de batimento cardíaco embrio-fetal, presença de fluidos uterinos anecogénicos e, a partir do dia 42 de gestação, o registo de movimentos fetais (Descôteux, Carrière & Durocher, 2006). Todas as vacas que revelaram cio após a IA, cujo DG foi negativo, ou que evidenciaram morte embrio-fetal, deixaram de ser acompanhadas. Por razões de logística foi escolhido o dia 19 pós-IA para avaliação do CL de fim de ciclo éstrico, o que ocorreu às quartas-feiras. Todos os outros exames foram realizados às sextas-feiras (Tabela 3).

Todos os exames ultrassonográficos foram realizados pelo mesmo técnico. As medições e a recolha de dados foram efetuadas por um auxiliar.

Tabela 3 - Desenho experimental e eventos associados

Dia após IA	Dia da semana	Eventos associados
-1	5ª-feira	Medição ecográfica do FPO
7	6ª-feira	Medição ecográfica do CL (fase de crescimento)
14	6ª-feira	Medição ecográfica do CL maduro (fase estática)
19	4ª-feira	Medição ecográfica do CL em regressão ou do CL em manutenção (se vaca gestante)
35	6ª-feira	Diagnóstico de gestação Medição ecográfica do CL (se diagnóstico positivo) Período embrionário tardio
42	6ª-feira	Início do período fetal precoce Verificação da viabilidade fetal Medição ecográfica do CL (se feto presente e viável)
63	6ª-feira	Fim do período fetal precoce Verificação da viabilidade fetal Medição ecográfica do CL (se feto presente e viável)

### 2.3 Recolha de dados

Para a monitorização do FPO, do CL, da viabilidade fetal e para o diagnóstico de gestação, em tempo-real, foi utilizado o ecógrafo Tringa Linear (Esaote Piemedical, Holanda) munido de uma sonda de multifrequência linear transrectal de 6-8 MHz. Durante o exame ecográfico, tanto do FPO como do CL, tentou obter-se um corte transversal que representasse a maior área possível. Após congelamento da imagem da estrutura em estudo foi possível medir o diâmetro maior e o menor. Para a determinação da área e do volume, utilizou-se a função elipse do ecógrafo, através da aplicação de 5 ou mais pontos nos limites do FPO ou do CL, criando-se uma elipse que delimitava, aproximadamente, os contornos da estrutura em análise e calculava automaticamente os valores da área e volume. Os valores obtidos nas medições (diâmetro maior e menor, área e volume) e todas as observações relacionadas com o exame, eram apontados no local e, posteriormente, introduzidas numa tabela realizada no programa Microsoft Office Excel® (Anexo 1). Os dados relativos à paridade, número de lactações, dias em lactação e sémen utilizado em cada IA foram obtidos através da base de dados da exploração Alpro™ De Laval. Após tratamento dos dados foi criada uma nova tabela apenas com os animais que se adequavam ao presente estudo (Anexo 2).

### 2.4 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com recurso ao *software* estatístico R (versão 2.4-1). Optou-se por realizar o cálculo da área do corte transversal do CL (elíptica), denominada área real (AR), em vez da área e volume obtidos na avaliação ecográfica das estruturas em estudo de forma a simplificar a análise estatística. Para tal foi aplicada a seguinte fórmula ( $\text{cm}^2$ ):  $AR = \pi \times (DM/2) \times (Dm/2)$ , em que DM e Dm correspondem ao diâmetro maior e menor do CL, respetivamente (Kastelic *et al.*, 1990; Gaja *et al.*, 2013). Foi calculada a diferença entre a AR do CL de medições consecutivas do mesmo animal, por exemplo, foi subtraída a AR do CL de dia 7 da AR do CL de dia 14, e assim sucessivamente sempre que os dados o permitiram.

Em primeiro lugar foi feita a comparação da AR do FPO e da AR do CL dele resultante, quanto à paridade e ao número de ovulações. Posteriormente, foram analisadas em separado as vacas com ovulação simples (Grupo ovsimples) e dupla (Grupo ovdupla), tendo em conta o DG nos dias 35, 42 e 63 pós-IA. Por último, comparou-se a AR do CL ipsilateral à gestação com o CL contralateral em vacas com ovulação dupla, como amostras independentes.

Para a comparação das áreas do FPO e CL quanto à paridade e tipo de ovulação, foi previamente avaliada a normalidade das variáveis em estudo com o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, isto é, para as AR do FPO (d -1) e do CL de dia 7, 14, 19, 35, 42 e 63.

Consoante o resultado do teste de normalidade foi aplicado o teste adequado à comparação dos dois grupos. No caso da verificação de uma distribuição normal aplicou-se o teste *t* para amostras independentes; caso contrário, realizou-se o teste não paramétrico de *Wilcoxon*. A mesma sequência de testes foi aplicada para a comparação das áreas do FPO (d -1) e CL dos dias 7, 14 e 19 de vacas gestantes e não gestantes quanto ao DG aos 35 dias, tanto no Grupo ovsimples como no Grupo ovduplas, e CL de dia 7, 14, 19 e 35 em relação ao DG 42 dias após IA, apenas no Grupo ovsimples, pois só se verificaram casos de mortalidade embrionária tardia/fetal precoce neste grupo. As correlações entre as áreas do FPO e CL subsequente em vacas gestantes e vazias, nos Grupos ovsimples e ovdupla, foram calculadas através da correlação de ordem de classificação de *Spearman*. Para cada análise foi atribuído um valor de *p* de 0,05.

### 3. Resultados

A média de dias em leite até ao primeiro serviço após o parto foi, na amostra, de 74,2 dias (*SD* = 3,7). No total, foi utilizado para as IA sémen proveniente de 16 touros (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição do sémen utilizado nas IA nos animais do ensaio

<b>Touro</b>	<b><i>n</i></b>	<b><i>fr</i> (%)</b>
<b>Josuper</b>	1	1,45
<b>Presley-red</b>	1	1,45
<b>Trueshot</b>	1	1,45
<b>Amulet</b>	2	2,90
<b>Feature</b>	2	2,90
<b>Fireup</b>	2	2,90
<b>Flywheel</b>	2	2,90
<b>Hattrick</b>	3	4,35
<b>Jethro</b>	4	5,80
<b>Marlon</b>	4	5,80
<b>Superstar</b>	4	5,80
<b>Brecken</b>	6	8,70
<b>Butler</b>	7	10,1
<b>Francisco</b>	7	10,1
<b>Solaris</b>	11	15,9
<b>Collude</b>	12	17,4
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>99,9</b>

Apenas 22 vacas mantiveram a sua gestação até ao final do estudo (31,9%). No primeiro diagnóstico de gestação foram encontradas 26 fêmeas gestantes (37,7%), sendo que até aos 42 dias, 3 destes animais abortaram espontaneamente (11,5%) e entre os 42 e 63 dias mais uma vaca sofreu perda gestacional (3,8%). As perdas de gestação verificaram-se apenas no Grupo de ovulação simples. Na Tabela 5 encontra-se a distribuição da amostra em relação à paridade e ao tipo de ovulação.

Tabela 5 - Distribuição das vacas quanto ao número de ovulações e paridade

	<b>Primíparas</b>	<b>Múltiparas</b>	<b>Total</b>
<b>Ovsimples</b>	36	19	<b>55</b>
<b>Ovduplas</b>	4	10	<b>14</b>
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>29</b>	<b>69</b>

### 3.1 Vacas primíparas versus múltiparas

Em relação à paridade, na amostra em estudo, 58% vacas eram primíparas e 42% eram múltiparas (Tabela 5). Das vacas gestantes aos 35 dias, cerca de 57,7% eram primíparas e 42,3%, múltiparas. A média do número de dias em leite foi de 74,4 ( $SD = 3,56$ ) para o grupo das primíparas e 73,9 ( $SD = 3,98$ ) para as múltiparas, na altura da IA. O número de lactações das vacas múltiparas foi, em média, 3,41 ( $SD = 1,32$ ). No grupo das primíparas, 90% ovularam apenas um folículo e 10% exibiram uma ovulação dupla bilateral. Nas múltiparas, 65,5% fêmeas apresentaram uma ovulação simples e 34,5% fêmeas ovulações duplas bilaterais (Tabela 5). No caso das vacas com ovulação dupla, em todos os cálculos foram contabilizados e monitorizados os FPO ou CL dos dois ovários. No total foram comparadas as áreas de 40 FPO de vacas primíparas e 36 FPO de vacas múltiparas (Tabela 6). Foram excluídos 7 FPO por ausência de dados resultantes de erros técnicos (3 de vacas múltiparas e 4 de vacas primíparas). Não foram encontradas diferenças significativas entre a área do FPO de primíparas ( $Mdn = 1,51 \text{ cm}^2$ ) e a área do FPO de múltiparas ( $Mdn = 1,38 \text{ cm}^2$ ),  $W = 691$ ,  $p = 0,76$ .

Tabela 6 - Distribuição da amostra de FPO quanto à paridade e tipo de ovulação

<b>FPO</b>	<b>Primíparas</b>	<b>Múltiparas</b>
<b>Ovulação simples</b>	34	18
<b>Ovulação dupla bilateral</b>	6	18
<b><i>n</i></b>	<b>40</b>	<b>36</b>

Quanto à comparação das áreas do CL nos dias 7, 14, 19, 35, 42 e 63, entre os dois grupos em estudo, não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 7 e 8).

Tabela 7 - Comparação da área do CL quanto à paridade das variáveis sem distribuição normal

	Primíparas		Multíparas		Teste de Wilcoxon
	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>N</i>	
ARCL de dia 7	4,85	44	4,27	39	$W = 709; p = 0,18$
ARCL de dia 14	4,78	44	4,88	38	$W = 873; p = 0,73$
ARCL de dia 19	4,10	42	3,82	35	$W = 707; p = 0,78$
ARCL de dia 42	4,88	15	4,71	9	$W = 59; p = 0,63$

Tabela 8 - Comparação da área do CL quanto à paridade, relativamente às variáveis com distribuição normal

	Primíparas			Multíparas			Teste <i>t</i>
	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>N</i>	
ARCL de dia 35	4,73	1,73	15	4,57	1,15	11	$t(23,8) = -0,27; p = 0,79$
ARCL de dia 63	5,09	0,90	13	5,50	0,85	9	$t(17,9) = 1,09; p = 0,29$

### 3.2 Vacas com ovulação simples versus ovulação dupla

Na amostra, cerca de 79,7% das vacas exibiram ovulação simples e 20,3%, ovulação dupla bilateral (Tabela 5). Foi comparada a área de 24 FPO do Grupo ovdupla ( $Mdn = 1,32 \text{ cm}^2$ ) com a área 52 FPO do Grupo ovsimples ( $Mdn = 1,60 \text{ cm}^2$ ), não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas,  $W = 475$ ,  $p = 0,097$ . Não foram, igualmente, encontradas diferenças significativas, nas áreas do CL nos dias 7, 14, 19, 35, 42 e 63 pós-IA, entre os dois grupos em análise (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 - Comparação da área do CL quanto ao tipo de ovulação, relativamente às variáveis sem distribuição normal

	Ovsimples		Ovdupla		Teste de Wilcoxon
	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	
ARCL de dia 7	4,71	55	4,15	28	$W = 646; p = 0,23$
ARCL de dia 14	4,70	55	5,09	27	$W = 741; p = 0,99$
ARCL de dia 19	3,28	49	4,10	28	$W = 547; p = 0,14$
ARCL de dia 42	4,89	18	4,46	6	$W = 31,5; p = 0,14$

Tabela 10 - Comparação da área do CL quanto ao tipo de ovulação, relativamente às variáveis com distribuição normal

	Ovsimples			Ovdupla			Teste <i>t</i>
	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	
<b>ARCL de dia 35</b>	4,77	1,57	20	4,31	1,20	6	<i>t</i> (10,7) = -0,77; <i>p</i> = 0,46
<b>ARCL de dia 63</b>	5,21	0,89	16	5,41	0,91	6	<i>t</i> (8,87) = 0,46; <i>p</i> = 0,65

### 3.3 Grupo ovulação simples

Neste grupo foram incluídos 55 animais, em que cerca de 65,5% eram primíparas e 34,5%, múltiparas (Tabela 5). Aproximadamente 52,8% (*n* = 28) dos animais ovularam no ovário direito e 47,2% (*n* = 25) no lado esquerdo. Ao primeiro DG 36,3% das fêmeas estavam gestantes. A taxa de mortalidade até ao dia 63 foi de 20% (Tabela 11). Dos animais gestantes 65% eram fêmeas primíparas e 35% múltiparas (Tabela 12).

Tabela 11 - Taxas de gestação e de mortalidade no Grupo de ovulação simples

Ovulação simples	
<b>Taxa de gestação</b>	36,4% ( <i>n</i> = 20)
<b>Taxa de MET</b>	15% ( <i>n</i> = 3)
<b>Taxa de MFP</b>	5% ( <i>n</i> = 1)

Tabela 12 - Taxas de gestação e de mortalidade em relação à paridade no Grupo de ovulação simples

	Taxa de gestação	Taxa de MET	Taxa de MFP
<b>Primíparas</b>	65% ( <i>n</i> = 13)	7,7% ( <i>n</i> = 1)	7,7% ( <i>n</i> = 1)
<b>Múltiparas</b>	35% ( <i>n</i> = 7)	28,6% ( <i>n</i> = 2)	-

Não foram encontradas diferenças significativas entre a área do FPO de vacas gestantes (*Mdn* = 1,65 cm<sup>2</sup>; *Mdn* = 1,76 cm<sup>2</sup>) e não gestantes (*Mdn* = 1,60 cm<sup>2</sup>; *Mdn* = 1,04 cm<sup>2</sup>) aos 35 e 42 dias (*W* = 322, *p* = 0,99 e *W* = 37,5, *p* = 0,22, respetivamente). Também não existiram correlações com significância estatística entre a área do FPO e a área dos CL subsequentes nas vacas não gestantes (Tabela 13) e gestantes (Tabela 14).



Tabela 13 - Teste de correlação entre a área do FPO e a área do CL em vacas não gestantes (ovsimples)

Dia após IA	Teste de correlação de <i>Spearman</i>
7	$r = 0,10; p = 0,58$
14	$r = 0,14; p = 0,45$
19	$r = 0,29; p = 0,16$

Tabela 14 - Teste de correlação entre a área do FPO e a área do CL em vacas gestantes (ovsimples)

Dia após IA	Teste de correlação de <i>Spearman</i>
7	$r = -0,004; p = 0,99$
14	$r = 0,29; p = 0,21$
19	$r = 0,17; p = 0,48$
35	$r = 0,40; p = 0,08$
42	$r = 0,14; p = 0,60$
63	$r = -0,13; p = 0,63$

Nas comparações das AR dos CL quanto ao DG no dia 35, observou-se uma maior AR do CL no dia 14 em fêmeas gestantes que em não gestantes (Gráfico 2, Tabela 15). Nos restantes dias não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 15). Do mesmo modo não se registaram diferenças na comparação das AR do CL quanto ao DG de dia 42 (Tabela 16).

Tabela 15 - Comparação da área do CL quanto ao diagnóstico de gestação no dia 35 (ovsimples)

	Gestantes			Não gestantes			Teste de <i>Wilcoxon</i>
	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>		<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>		
ARCL de dia 7	5,45	20		4,56	35		$W = 435; p = 0,14$
	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	Teste <i>t</i>
ARCL de dia 14	5,57	1,65	20	4,36	1,41	35	$t(34,9) = 2,75; p = 0,009^*$
ARCL de dia 19	4,67	1,45	20	4,09	1,85	35	$t(46,2) = 1,22; p = 0,23$

\*  $p < 0,05$

Gráfico 1 - *Boxplot* da área do CL aos 14 dias consoante o DG aos 35 dias (ovsimples)

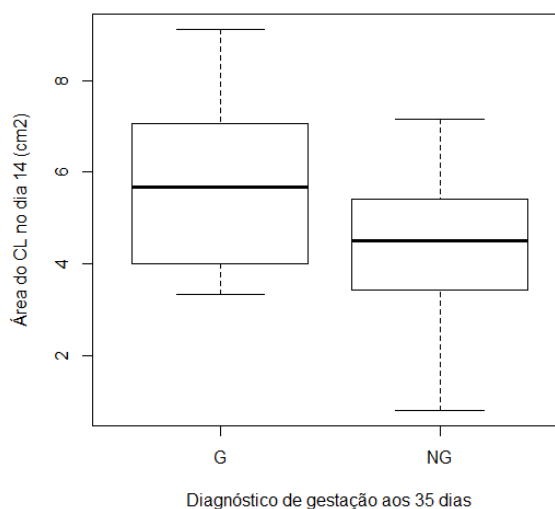


Tabela 16 - Comparação da área do CL quanto ao diagnóstico de gestação no dia 42 (ovsimples)

	Gestantes			Não gestantes			Teste de Wilcoxon
	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>		<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>		
<b>ARCL de dia 7</b>	5,52	17		3,88	3		$W = 35,5; p = 0,49$
	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	Teste <i>t</i>
<b>ARCL de dia 14</b>	5,38	1,70	17	6,65	0,84	3	$t(5,58) = -2,00; p = 0,096$
<b>ARCL de dia 19</b>	4,47	0,97	17	5,77	3,19	3	$t(2,07) = -0,70; p = 0,55$
<b>ARCL de dia 35</b>	4,62	1,46	17	5,62	2,28	3	$t(2,30) = -0,73; p = 0,53$

Em relação à variação entre as médias da AR de medições consecutivas do CL quanto ao DG dos dias 35 e 42, não foram registadas diferenças significativas (Tabelas 17 e 18).

Tabela 17 - Comparação da diferença das áreas do CL entre medições consecutivas quanto ao DG no dia 35 (ovsimples)

	Gestantes			Não gestantes			Teste de Wilcoxon
	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>		<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>		
<b>Dia 14 e 7</b>	-0,27	20		-0,14	35		$W = 366; p = 0,79$
	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	Teste <i>t</i>
<b>Dia 19 e 14</b>	-0,90	1,60	20	-0,16	2,19	29	$t(46,8) = -1,38; p = 0,17$

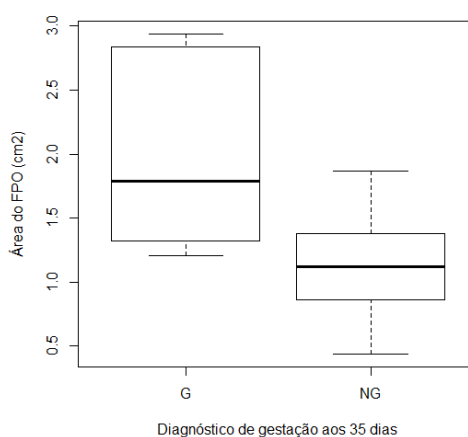
Tabela 18 - Comparação da diferença das áreas de CL entre medições consecutivas quanto ao DG no dia 42

	Gestantes			Não gestantes			Teste de Wilcoxon
	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>		<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>		
<b>Dia 14 e 7</b>	-0,43	17		2,72	3		$W = 11,5; p = 0,15$
	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	Teste <i>t</i>
<b>Dia 19 e 14</b>	-0,91	1,45	17	-0,88	2,73	3	$t(2,20) = -0,016; p = 0,99$
<b>Dia 35 e 19</b>	0,15	1,32	17	-0,15	3,51	3	$t(2,10) = 0,15; p = 0,90$

### 3.4 Grupo ovulação dupla

No Grupo de ovulação dupla, cerca de 28,6% das fêmeas eram primíparas e 71,4% multíparas (Tabela 5). Ao primeiro DG, cerca de 42,9% ( $n = 6$ ) dos animais estavam gestantes, dos quais 33,3% ( $n = 2$ ) eram primíparas e 66,7% ( $n = 4$ ) eram multíparas. Todas as vacas gestantes mantiveram a sua gestação até aos 63 dias. Constatou-se que a área do FPO destas vacas ( $Mdn = 1,79 \text{ cm}^2$ ) era significativamente maior do que nas vacas vazias ( $Mdn = 1,12 \text{ cm}^2$ ),  $W = 53,5$ ,  $p = 0,043$  (Gráfico 2).

Gráfico 2 - *Bloxplot* da área do FPO ao DG aos 35 dias (ovdupla)



Não foram encontradas correlações estatisticamente significativas entre a área do FPO e a área do CL ipsilateral à gestação nos dias 7, 14 e 19 nas fêmeas não gestantes (Tabela 19) e, o CL nos dias 7, 14, 19, 35, 42 e 63 nas vacas gestantes (Tabela 20).

Tabela 19 - Teste de correlação entre a área do FPO e a área do CL, em vacas não gestantes (ovdupla)

Dia após IA	Teste de correlação de <i>Spearman</i>
7	$r = -0,07; p = 0,82$
14	$r = -0,08; p = 0,80$
19	$r = -0,23; p = 0,45$

Tabela 20 – Teste de correlação entre a área do FPO e a área do CL, em vacas gestantes (ovdupla)

Dia após IA	Teste de correlação de <i>Spearman</i>
7	$r = 0,21; p = 0,74$
14	$r = 0,10; p = 0,95$
19	$r = -0,05; p = 0,45$
35	$r = -0,67; p = 0,22$
42	$r = -0,40; p = 0,52$
63	$r = 0,60; p = 0,35$

Não foram encontradas diferenças significativas entre as áreas do CL ipsilateral à gestação e a do CL de fêmeas vazias (Tabela 21).

Tabela 21 - Comparação da área do CL quanto ao diagnóstico de gestação do dia 35 (ovdupla)

	Gestantes		Não gestantes		Teste de <i>Wilcoxon</i>
	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	
ARCL de dia 7	3,70	6	4,47	16	$W = 36; p = 0,40$
ARCL de dia 14	5,65	6	4,92	16	$W = 59; p = 0,45$
ARCL de dia 19	3,80	6	3,18	16	$W = 55,5; p = 0,61$

Não foram encontradas diferenças significativas na variação da área do CL em medições consecutivas entre vacas gestantes e não gestantes ao dia 35 (Tabela 22). Só foram avaliados os CL ipsilaterais à gestação.

Tabela 22 - Comparação da diferença das áreas de CL entre medições consecutivas quanto ao DG no dia 35 (ovdúpla)

	Gestantes			Não gestantes			Teste <i>t</i>
	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	
<b>Dia 14 e 7</b>	1,14	1,32	6	0,16	3,01	16	<i>t</i> (19,2) = 1,05; <i>p</i> = 0,31
<b>Dia 19 e 14</b>	-1,08	1,57	6	-1,34	2,04	16	<i>t</i> (11,7) = 0,31; <i>p</i> = 0,76

Em relação à comparação entre os CL ipsilateral e contralateral à gestação em fêmeas gestantes, não foram registradas diferenças com significância estatística (Tabela 23).

Tabela 23 - Comparação entre a área do CL ipsilateral e o CL contralateral em fêmeas gestantes no dia 35 (ovdúpla)

	CL Ipsilateral			CL Contralateral			Teste <i>t</i>
	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	<i>M</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>SD</i> (cm <sup>2</sup> )	<i>n</i>	
<b>Dia 7</b>	4,23	1,55	6	3,77	2,09	6	<i>t</i> (9,22) = -0,43; <i>p</i> = 0,68
<b>Dia 14</b>	5,37	1,39	6	3,78	1,83	5	<i>t</i> (7,40) = -1,59; <i>p</i> = 0,15
	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )		<i>n</i>	<i>Mdn</i> (cm <sup>2</sup> )		<i>n</i>	Teste de <i>Wilcoxon</i>
<b>Dia 19</b>	3,80		6	3,37		6	<i>W</i> = 18; <i>p</i> = 1

#### 4. Discussão

A taxa global da mortalidade embrio-fetal, em vacas leiteiras de alta produção, encontra-se situada entre os 40-60% (Santos *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2010; Ayad *et al.*, 2012). No presente estudo, a taxa de MET mais a da MFP, até aos 63 dias, foi de 15,4%, mas é preciso ter-se em conta que o número de vacas com DG positivo aos 35 dias correspondeu a cerca de 37,7% (*n* = 26) da amostra total, ou seja, poucas fêmeas ficaram gestantes e, para além disso, não foi quantificada a mortalidade embrionária precoce nem a fetal tardia. A taxa de MET está compreendida entre os 10-12% (Tatcher *et al.*, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1997; Inskeep, 2004 citado por Ayad *et al.*, 2012). No presente ensaio experimental, só foi possível determinar a mortalidade embrionária tardia entre os dias 35 e 42 pós-IA (11,5%). Assim, era de se esperar que a taxa da MET fosse inferior, pois este período vai do dia 25 até ao dia 42 (Humblot, 2001), deixando uma janela com cerca de 10 dias em que não foi possível contabilizar as perdas de gestação. Apenas uma vaca diagnosticada como gestante no dia 35 sofreu um aborto espontâneo entre os dias 42 e 63 (3,8%). Note-se que apenas foi determinada a taxa de mortalidade fetal precoce e que os valores reportados

referem-se ao período fetal total (5-6%), sendo que estes podem atingir os 10% (López-Gatius *et al.*, 2002).

Segundo o que é referido na bibliografia, é no período embrionário precoce que ocorrem a maioria das perdas de gestação (Berg *et al.*, 2010; Lonergan, Spencer & Forde, 2016a; Wiltbank *et al.*, 2016a). Neste ensaio, não foi possível determinar a taxa da MEP. É importante ter em consideração que essas perdas ocorrem antes do reconhecimento materno da gestação, que tem início 16 dias após a IA (Gábor *et al.*, 2016), não alterando a duração do ciclo éstrico (Humblot, 2001). Desta forma, com os meios disponíveis não foi possível diferenciar a ausência de fertilização da morte embrionária.

A utilização do sémen da amostra não foi homogênea na sua distribuição (Tabela 4), por isso, a sua influência na capacidade de fertilização e na mortalidade embrio-fetal não pode ser descartada. Segundo Inskeep & Dailey (2005), cerca de 10% das perdas de gestação são da responsabilidade do macho utilizado. Existe uma variação da fertilidade entre os machos, sendo a maioria difícil de diagnosticar através dos métodos tradicionais de avaliação do sémen. Uma percentagem dos insucessos parece estar relacionada com uma maior incidência de mortalidade embrionária precoce do que com uma menor capacidade de fertilização (Geary, 2005). Neste caso, há defeitos dos spz, a nível funcional e molecular, tais como cabeças ligeiramente deformadas e vacúolos nucleares que, após fertilização, diminuem a taxa de clivagem dos embriões, potenciando a ocorrência de mortalidade embrionária precoce (Saacke *et al.*, 2000), nomeadamente durante a primeira semana de gestação (Wiltbank *et al.*, 2016a). Outros autores referem que a utilização de sémen de determinados touros pode representar um fator de risco. Verificaram uma influência de um dos touros utilizados no seu estudo na mortalidade embrionária tardia e fetal precoce entre os dias 38 e 90, por transmissão de defeitos anatómicos e genéticos ou por infeção com origem em sémen contaminado (López-Gatius *et al.*, 2002; Jonker, 2004; Starbuck, Dailey & Inskeep, 2004).

No presente trabalho, 20% das vacas exibiram ovulações múltiplas, nomeadamente ovulações duplas bilaterais. São vários os autores que referem um aumento da incidência de ovulações múltiplas ao longo dos anos e, enfatizaram que ela é fortemente influenciada pelo aumento do pico da produção de leite. Os seus estudos demonstraram que vacas de elevada produção apresentam uma taxa de ovulação dupla entre 14 e 39% (Fricke & Wiltbank, 1999; Vasconcelos *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2005; Wiltbank *et al.*, 2006). Tendo em consideração o número de ovulações e a paridade, registou-se uma maior percentagem de vacas múltíparas com dupla ovulação (34,5%;  $n = 10/29$ ) do que nas vacas primíparas (10%;  $n = 4/14$ ). Lopez *et al.* (2005) verificaram que 27% ( $n = 61/223$ ) das vacas múltíparas fizeram ovulação dupla, enquanto que nas primíparas, a frequência de ovulações duplas foi de 18% ( $n = 43/240$ ). No estudo realizado por López-Gatius *et al.* (2005), a ocorrência de ovulações duplas aumentou com a paridade e idade da vaca. Verificou-se ainda que na

primeira lactação a taxa de ovulação múltipla foi de 6,7%, aumentando para 16,6% na lactação seguinte e para 25% em vacas com três ou mais lactações. Fricke & Wiltbank (1999) observaram igualmente uma tendência para maior ocorrência de ovulações múltiplas em vacas múltiparas. O motivo aparente desse aumento foi que a proporção de vacas com alta produção de leite dentro de cada grupo foi mais elevada nas vacas mais velhas. Assim, a fisiologia da alta produção de leite, por si só, parece aumentar a incidência da ovulação dupla, independentemente de idade ou paridade (Wiltbank *et al.*, 2006). A explicação mais plausível para este fenómeno é o aumento da taxa de metabolismo das hormonas esteróides, por aumento do consumo de alimento e do fluxo sanguíneo hepático associado à maior produção de leite (Sangsritavong *et al.*, 2002; Wiltbank *et al.*, 2006). O desenvolvimento folicular sob influência de uma menor concentração de  $P_4$  está associado a uma menor frequência de pulsos de GnRH e, conseqüentemente, a uma menor frequência de pulsos de LH e FSH que levam à co-dominância folicular e, por isso, às ovulações múltiplas (Lopez *et al.*, 2005).

#### **4.1 Área do FPO e CL de primíparas *versus* múltiparas**

Num estudo realizado por Tenhagen *et al.* (2003) verificou-se que as vacas primíparas exibiam folículos de menores dimensão, que ovulavam mais cedo e que tendiam a ter taxas de concepção mais altas que as múltiparas (Peters & Pursley, 2002; Tenhagen *et al.*, 2004; Wolfenson *et al.*, 2004). Este facto deve-se a uma propensão para um maior período de dominância folicular em vacas do que em novilhas, possivelmente por um aumento do intervalo de tempo entre a administração da  $PGF_{2\alpha}$  e a ovulação (Sartori, Rosa & Wiltbank, 2002). No presente estudo experimental não se encontraram diferenças ao nível da área do FPO (Sartori, Rosa & Wiltbank, 2002), mas observou-se uma frequência mais elevada de vacas primíparas (57,7%;  $n = 15/26$ ) do que múltiparas (42,3%;  $n = 15/26$ ) gestantes aos 35 dias. Alguns artigos referem ainda uma tendência para um CL de maiores dimensões em vacas múltiparas (Sartori, Rosa & Wiltbank, 2002; Wolfenson *et al.*, 2004), devido a uma correlação positiva significativa entre o tamanho do FPO e o tamanho do CL (Sartori, Rosa & Wiltbank, 2002). De acordo com os resultados agora obtidos da área do FPO, também não foram encontradas diferenças na área do CL entre primíparas e múltiparas. Assim sendo e por questões de logística a nível do estudo estatístico, na avaliação da relação do tamanho do FPO, CL e gestação nas vacas com ovulação simples e dupla, não foi tida em conta a paridade do animal.

#### **4.2 Área do FPO e CL de ovulação simples *versus* ovulação dupla**

Em relação à área do FPO e CL entre os Grupos ovsimples e ovdupla não foram encontradas diferenças significativas. Mann, Robinson & Hunter (2007) também reportaram a inexistência de desigualdade na dimensão do FPO entre os dois grupos, mas verificaram que a ovulação dupla está associada a CL individuais mais pequenos, mas sem diferença

no peso total do tecido lúteo, nem na concentração plasmática de  $P_4$  (Starbuck, Dailey & Inskeep, 2004). Apesar do facto do diâmetro de cada CL diminuir com o aumento da taxa de ovulação, outros autores verificaram que o volume total do tecido lúteo por fêmea e a concentração de  $P_4$  após ovulação aumentavam, evidenciando uma correlação positiva entre ambos (Echternkamp, Cushman & Allan, 2009). Também se verificou que o tamanho máximo do FPO de ovulações simples foi maior que o tamanho máximo ou a média de todos os FPO de ovulações duplas (Sartori *et al.*, 2004) e que há uma tendência geral para uma diminuição do diâmetro folicular quando aumenta a taxa de ovulação (Echternkamp, Cushman & Allan, 2009). Dadas estas observações sobre a dimensão dos CL e a concentração de  $P_4$  nas ovulações duplas em relação às ovulações singulares, optou-se neste ensaio, apesar da ausência de diferenças entre a área folicular e lútea quanto ao número de ovulações, por avaliar a relação entre o FPO, CL e gestação de ovulações simples e ovulações duplas em separado.

#### **4.3 Relação da área do FPO com a do CL subsequente e com a gestação**

Vernunft, Weitzel & Viergutz (2013) observaram no seu estudo, a existência de uma correlação positiva entre o diâmetro do FPO e a área transversal do CL subsequente. Vários autores reportaram que a ovulação de folículos de menores dimensões (<11-11,5 mm de diâmetro) está associada a um menor volume do CL no dia 7 e 14 após a IA, a uma menor taxa de gestação e a um aumento da taxa MET (Dickinson *et al.*, 2016). Estas situações estão relacionadas com uma diminuição da concentração do  $E_2$  no dia da IA, a um aumento mais lento das concentrações de  $P_4$  após a IA e, por último, a menores concentrações sistémicas de  $P_4$  (Vasconcelos *et al.* 2001; Perry *et al.*, 2005; Atkins *et al.*, 2013). Estas alterações nas concentrações nas hormonas esteróides vão ter implicações na fase de fixação do embrião ao útero materno (dias 21-42), por um desenvolvimento inadequado do embrião e/ou por um ambiente uterino sub-ótimo, que se repercutem num desenvolvimento placentário deficiente aumentando a mortalidade no período embrionário tardio (Perry *et al.*, 2005). Contrariamente ao reportado, não foram encontradas, no presente trabalho, correlações significativas entre a área do FPO e a área do CL de vacas gestantes (nas medições entre os dias 7 e 63) e não gestantes (nos dias 7,14 e 19), tanto em vacas do Grupo ovsimples como do Grupo ovdupla. Neste ensaio experimental, quando foi avaliada a área do FPO quanto ao diagnóstico de gestação no dia 35, foram encontradas diferenças significativas no Grupo ovdupla. Neste caso, a área do FPO foi maior nas vacas gestantes do que nas vacas vazias. O mesmo não se verificou no Grupo ovsimples, onde não se revelaram diferenças entre as dimensões foliculares de fêmeas gestantes e não gestantes. Não se encontraram diferenças na área do FPO entre fêmeas gestantes e não gestantes no dia 42 pós-IA no Grupo ovsimples. Note-se que apenas foram comparadas as áreas dos FPO de três vacas que perderam a sua gestação entre os dias 35 e 42, com 17 FPO de



fêmeas que mantiveram a gestação. Como já foi referido, a dimensão folicular e a duração do pró-estro têm influência, quer na maturação do oócito, quer na capacidade funcional do CL e, por isso, na manutenção da gestação (Vasconcelos *et al.* 2001; Peters & Pursley, 2003; Bridges *et al.*, 2010). Mesmo assim, não existe concordância entre os vários estudos que relacionam a dimensão do FPO com a taxa de gestação. Por exemplo, Sá Filho *et al.* (2009) verificaram que o diâmetro folicular afetava positivamente a ovulação e a taxa de gestação, em oposição a Tarso *et al.* (2016) que observaram que taxa de gestação foi similar em todas as categorias de diâmetro folicular em estudo. Starbuck, Dailey & Inskeep (2004) também não encontraram qualquer influência do diâmetro folicular na manutenção da gestação.

No presente estudo, o tamanho folicular foi independente do número de ovulações. Desta forma, não era de esperar encontrarem-se diferenças na dimensão do FPO quanto ao DG no dia 35 apenas no Grupo ovdupla. Ou seja, se *a priori* não houve diferenças entre os FPO de vacas com ovulação simples e os de vacas com múltipla ovulação, também não deveria haver diferença na comparação da área do FPO quanto ao DG no dia 35 entre o Grupo ovsimples e ovdupla. Esta deveria estar presente ou ausente da mesma forma nos dois grupos. As possíveis explicações poderão ser: o número da amostra, no geral, ser reduzido; e o Grupo ovdupla comparar apenas 5 FPO de vacas gestantes com 13 FPO de vacas não gestantes.

#### **4.4 Influência da área do CL na obtenção da gestação**

Nas comparações das áreas do CL nos dias 7, 14 e 19, entre animais gestantes e não gestantes quanto ao DG no dia 35, apenas foram encontradas diferenças significativas no dia 14 no Grupo ovsimples. Neste caso, as vacas gestantes apresentaram uma maior área lútea que as vacas não gestantes. Esta diferença pode ser atribuída à ação do INFT, pois há evidência que a secreção do INFT pelo conceito tem início 12 dias após a ovulação (Robinson *et al.*, 1999; Wiltbank *et al.*, 2016a). O INFT produz um efeito local no endométrio que inibe a libertação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (responsável por desencadear a luteólise), mantendo a produção de  $\text{P}_4$  pelo CL, que é essencial à manutenção da gestação. Por outro lado, foi igualmente reportado que promove a secreção uterina de  $\text{PGE}_2$ , conhecida também pelas suas ações luteotrópicas (Spencer, Forde & Lonergan, 2015; Arosh, Banu & McCracken, 2016; Wiltbank *et al.*, 2016), que possui um efeito endócrino e local no próprio CL (Antoniazzi *et al.*, 2013) e ainda que regula a população de PMN envolvida na manutenção da função do CL (Shimizu *et al.*, 2012; Shirasuna *et al.*, 2015). Siqueira *et al.* (2008) verificaram que a área do tecido lúteo durante o ciclo éstrico aumenta até ao seu valor máximo no dia 10, atingindo um plateau até ao dia 14 após o estro, momento em que poderá iniciar o seu declínio. Alguns autores não detetaram quaisquer diferenças no diâmetro, área do CL e concentração de  $\text{P}_4$  nos dias 7 e 14 (Feliciano, Mateus & Costa,

2003) e na área do CL nos dias 7-18 (Scully *et al.*, 2015) entre fêmeas gestantes e vazias. Kastelic, Bergfelt & Guinther (1990) só registaram uma menor área lútea e concentração de  $P_4$  no dia 19 e 17, respetivamente, em vacas não gestantes quando comparado com gestantes. Segundo Guimarães *et al.* (2015), o tamanho do CL no dia 21 é bom indicador de possível gestação, pois as vacas que no DG estavam vazias apresentaram um CL de menores dimensões que as que se revelaram gestantes, devido à ocorrência da luteólise estrutural. Considerando estas observações, o facto de não se ter obtido, no presente trabalho, uma diferença significativa entre vacas gestantes e vazias no dia 19, entre os Grupos ovsimples e ovdupla, foi um resultado inesperado. A duração média do ciclo éstrico nas vacas leiteiras é de 21 dias. Em 2000, Royal *et al.* realizaram um estudo sobre o declínio da fertilidade das vacas leiteiras e verificaram que a média da duração do ciclo em 1995-1998 (22,33 dias) aumentou 2,1 dias em relação à estimada em 1972-1982 (20,2 dias). Somando a isto, a luteólise funcional precede a estrutural cerca de 24-36 horas (Neuvians *et al.*, 2004; Sugino & Okuda, 2007). Assim sendo, a ausência de diferenças no dia 19 pode ser devida à não coincidência com a luteólise estrutural em fêmeas vazias. Apesar disso, não deixa de ser um resultado com pouco sentido fisiológico, na medida em que se a diferença entre a área do CL das fêmeas que mantiveram a gestação e das não gestantes se verificou no dia 14, esta deveria ter-se mantido de então em diante. Em relação à diferença da área do CL aos 14 dias quanto ao DG no dia 35, foram obtidos resultados diferentes no Grupo ovsimples (diferença significativa) e ovdupla (diferença não significativa). Mais uma vez, tal como na avaliação do FPO, não foram encontradas diferenças entre as várias mensurações do CL entre os dois grupos, possivelmente pelas mesmas razões já descritas.

Segundo Gaja *et al.* (2013) vacas previamente inseminadas revelaram estar definitivamente vazias quando a regressão lútea excedeu os 25%, entre dois exames ultrassonográficos com um intervalo de 7 dias (tendo sido realizado o primeiro exame entre os dias 13 e 16 pós-IA). Quando aquele valor foi inferior a 10%, a vaca estaria provavelmente gestante. Há estudos que mencionam uma relação entre a concentração de  $P_4$  no dia 14 (Kenyon *et al.*, 2013) e na semana 5 (Starbuck, Dailey & Inskeep, 2004) com a mortalidade embrionária tardia. Como tal e visto o volume do tecido lúteo ser um dos fatores primários à produção de  $P_4$  (Wiltbank *et al.*, 2014), no atual ensaio experimental, foram avaliadas as diferenças de área do CL entre medições sucessivas em relação ao diagnóstico de gestação no dia 35, em ambos os grupos e, no dia 42, apenas no Grupo ovsimples (ausência de MET e MFP no Grupo ovdupla). No Grupo ovsimples, a média do valor da diferença da área do CL de 14 e de dia 7 foi negativa, o que também foi um achado inesperado, provavelmente pelo facto do CL não ter sido avaliado quanto à existência possível de cavidade ou por erros técnicos (ver nas limitações do estudo).

No presente trabalho, em nenhum dos grupos foram encontradas diferenças significativas entre os CL das fêmeas que perderam e que mantiveram a gestação, sendo que é preciso ter em consideração, mais uma vez, que apenas três vacas perderam a gestação entre os dias 35 e 42, o que representa uma amostra extremamente reduzida e, por isso, pouco fidedigna. Talvez pela mesma razão, a média da área do CL nos dias 19, 21 e 35 das vacas que sofreram MET, seja maior que nas vacas que mantiveram a sua gestação. Como apenas uma vaca abortou espontaneamente no período fetal precoce, não foram realizadas comparações em relação ao DG ao dia 63.

Por último, nas vacas gestantes no Grupo ovdupla, não foram encontradas diferenças entre o CL ipsilateral e o contralateral à gestação. Nesta comparação as amostras foram consideradas independentes, apesar de serem utilizados valores da área do CL contralateral e ipsilateral à gestação provenientes do mesmo animal. Segundo Baez *et al.* (2017), a maior parte dos CL contralaterais induzidos regrediu, não no período de reconhecimento materno da gestação, mas sim durante o segundo mês de gestação, ao invés do CL ipsilateral que se manteve durante os dois períodos. É entre os dias 30 e 60 que ocorre o fenômeno da placentação, possivelmente envolvido na manutenção do CL nesta fase. Das seis vacas gestantes neste Grupo, quatro perderam o CL contralateral entre os dias 21 e 35 e apenas uma entre os dias 42-63, período de tempo em que se inicia a formação dos placentomas (Aires *et al.*, 2014) e ocorre um aumento do fluxo sanguíneo no corno uterino ipsilateral à gestação (Silvia & Ginther, 2009). Não esquecer que foi referido por Antoniazzi *et al.* (2013) a possibilidade do INFT ter ações luteotrópicas sistêmicas e endócrinas, não sendo por isso descabida a capacidade de manutenção do CL contralateral durante o reconhecimento materno da gestação.

Herzog *et al.* (2010) mencionam que o fluxo sanguíneo lúteo reflete com melhor precisão a função lútea. O modo Doppler pode ser aplicado durante o exame ecográfico do CL, permitindo avaliar a perfusão sanguínea através de cores, azul e vermelho, que indicam a direção do fluxo sanguíneo em relação à sonda (Givens, 2015). Guimarães *et al.* (2015) verificaram que fêmeas com fluxo sanguíneo elevado ou regular apresentavam maiores concentrações de  $P_4$  em relação às fêmeas com fraca perfusão do CL. Ou seja, o fluxo sanguíneo lúteo está correlacionado positivamente com as concentrações plasmáticas de  $P_4$ . Assim, avaliando o fluxo sanguíneo do tecido lúteo nos dias 18-21 é possível identificar o CL em regressão na ausência de gestação (Herzog *et al.*, 2010; Scully *et al.*, 2014; Guimarães *et al.*, 2015). Kelley *et al.* (2017) tentaram avaliar a possibilidade de previsão da mortalidade embrionária tardia/fetal precoce através do estudo de função lútea com recurso à utilização do modo Doppler, no dia 34, mas não encontraram qualquer relação.

#### 4.5 Limitações do estudo

Neste ensaio experimental, tendo em consideração o desenho experimental do estudo, as rotinas diárias da exploração e ainda, a pouca experiência do operador que realizou os exames ultrassonográficos, existem alguns pontos que poderiam tornar o ensaio mais rigoroso e assim promover a obtenção de resultados mais representativos. Em primeiro lugar, na avaliação ecográfica do FPO e do CL, de forma a alcançar resultados mais rigorosos, deveriam ter sido mensuradas três imagens que correspondessem à maior área transversal da estrutura em análise e posteriormente, fazer o cálculo da média. Desta forma, seriam evitados erros relacionados com valores que não representassem a dimensão real da estrutura. Em segundo lugar, não foram contabilizados os corpos lúteos cavitários para que cada exame ecográfico fosse menos demorado e para facilitar a execução da análise estatística. O diâmetro da cavidade central pode variar entre 2 e 22 mm e, por norma, atinge o seu tamanho máximo 10 dias após a ovulação (Kastelic, Pierson & Ginther, 1990; Hanzen *et al.*, 2000). A incidência de um CL cavitário é variável entre os estudos, oscilando entre 40 a 70% (Kastelic, Bergfelt & Guinther, 1990; Siqueira *et al.*, 2009; Herzog *et al.*, 2010). A cavidade lútea pode regredir ou manter-se durante grande parte da fase de diestro, sendo que quanto maior a cavidade, maior a sua persistência (Kastelic, Bergfelt & Guinther, 1990; Siqueira *et al.*, 2009). Há registo da existência de CL cavitários até aos dias 20-40 da gestação (Kastelic, Bergfelt & Guinther, 1990). É importante ter em consideração que tanto a presença como o tamanho da cavidade não se repercutem nas concentrações plasmáticas de  $P_4$  (Kastelic, Pierson & Ginther, 1990) e que a quantidade de tecido lúteo é independente do diâmetro da sua cavidade, em fêmeas não gestantes. Em vacas gestantes, a quantidade de tecido lúteo é considerada maior na presença de uma cavidade grande (Kastelic, Pierson & Ginther, 1990). Desta forma, nos CL cavitários a área da cavidade devia ter sido mensurada/calculada e posteriormente subtraída da área total do CL (Kastelic, Bergfelt & Guinther, 1990; Kastelic, Pierson & Ginther, 1990; Mihm *et al.*, 1994; Sartori, Rosa & Wiltbank, 2002).

A ideia inicial do estudo era obter uma amostra em que, no mínimo, fosse possível ter um igual número de vacas primíparas e multíparas e eliminar o efeito do macho na mortalidade embrio-fetal. Tal não foi possível, pois o número de casos ficou dependente das vacas sujeitas ao primeiro serviço pós-parto no período de tempo entre Setembro de 2016 e Janeiro de 2017 e que responderam ao protocolo *Ovsynch*. Associado a estas circunstâncias, várias vacas tiveram que ser eliminadas do estudo reduzindo significativamente o número da amostra (Tabela 2).

#### 5. Conclusão

Pode pois, afirmar-se que a capacidade funcional do CL está relacionada com vários fatores, tais como, a estação do ano, o *stress* térmico, o tipo de alimentação, a condição

corporal, a capacidade de produção de leite, o estado de saúde, o tipo de manejo reprodutivo, entre outros. Todos eles acabam por ter repercussões na capacidade de síntese de gonadotrofinas, provocando alterações na ciclicidade reprodutiva da vaca e, consequentemente, no desenvolvimento folicular e também, na taxa de metabolização das hormonas esteróides. Assim sendo, acabam por ocorrer desequilíbrios hormonais que vão determinar o tamanho do FPO na altura da ovulação e a duração do pró-estro (quando a ovulação é espontânea ou por alterações no protocolo hormonal) e, por isso, na maturação do oócito e na capacidade funcional do tecido lúteo. Como vimos, o CL resulta de uma transformação morfológica e funcional das células da teca interna e da granulosa, que é caracterizada por uma alteração da via esteroidogénica, para que haja síntese de progesterona em vez de estradiol, justificando assim a sua dependência do ambiente folicular e da sua capacidade de secreção hormonal, nomeadamente de  $E_2$  pré-ovulatório, visto que estimula o pico de LH, responsável pela luteinização das células foliculares e de, na ausência de  $P_4$ , regular negativamente os recetores de OT evitando a regressão precoce do CL. No presente estudo, apenas foram encontrados resultados significativos no Grupo ovdupla, quando nas vacas gestantes foi evidenciada uma maior área folicular, o que pode ser reflexo das situações acima referidas. A avaliação do FPO antes da IA pode ser utilizada no intuito de prever, após a ovulação, a função lútea e a qualidade do oócito, apesar de, em termos práticos, ser uma tarefa difícil de implementar na dinâmica do manejo reprodutivo de uma exploração intensiva.

No ensaio experimental, só se encontraram diferenças significativas na área do CL no dia 14 após IA entre vacas gestantes e não gestantes com ovulação simples no dia 35. Contrariamente ao esperado e sem sentido fisiológico, essa diferença desapareceu ao dia 19. Na variação da área do CL em avaliações consecutivas quanto ao DG nos dias 35 e 42 também não foram encontradas diferenças significativas. Desta forma, não foi possível chegar a nenhuma conclusão acerca da utilidade da mensuração ecográfica do CL para o diagnóstico precoce de gestação e para a previsão da ocorrência de mortalidade embrio-fetal. A mortalidade embrionária diminui o benefício do diagnóstico de gestação precoce, porque fêmeas diagnosticadas mais cedo como gestantes, têm maior risco de perda embrionária que as que são detetadas mais tarde. Se entretanto ocorrer MEF e elas permanecerem com o estatuto positivo, irão diminuir a eficiência reprodutiva por aumento do intervalo parto-conceção. Assim, para que a deteção precoce de fêmeas gestantes traga vantagens na *performance* reprodutiva do efetivo, terão que ser realizados, posteriormente, mais DG que confirmem a manutenção da gestação (Fricke & Lamb, 2005).

No futuro seria interessante continuar a realização de mais estudos utilizando variação da área do CL ou do fluxo sanguíneo lúteo como forma de previsão da mortalidade embrio-fetal utilizando amostras maiores e protocolos experimentais mais rigorosos.

## Bibliografía

- Acosta, T.J., Hayashi, K.G., Othani, M. & Miyamoto, A. (2003). Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, 125, 759-767.
- Acosta, T.J. & Miyamoto, A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*, 82/83, 127-140.
- Acosta, T.J., Miyamoto, A., Ozawa, T., Wijayagunawardane, M.P.B. & Sato, K. (1998). Local release of steroid hormones, prostaglandin E<sub>2</sub>, and endothelin-1 from bovine mature follicles *in vitro*: effects of luteinizing hormone, endothelin-1, and cytokines. *Biology of Reproduction*, 59, 437-443.
- Acosta, T.J., Yoshizawa, N., Ohtani, M. & Miyamoto, A. (2002). Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F<sub>2α</sub> injection in the cow. *Biology of Reproduction*, 66, 651-658.
- Aires, M.B., Degaki, K.Y., Dantzer, V. & Yamada, A.T. (2014). Bovine placentome development during early pregnancy. In A. Méndez-Vilas (Ed.) *Microscopy: Advances in Scientific Research and Education*. (pp. 390-396). Badajoz, Spain: Formatex.
- Al-Gubory, K.H., Garrel, C., Faure, P. & Sugino, N. (2012). Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reproductive BioMedicine Online*, 25, 551-560.
- Amaya, A.D. (2010). Efecto del diámetro del folículo ovulatorio, tamaño del cuerpo lúteo y perfiles de progesterona sobre la tasa de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos. Maestría en Salud Animal. Bogotá: Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia – Universidad Nacional de Colombia.
- Amselgruber, W., Sinowatz, F., Schams, D. & Skotter, A. (1994). Immunohistochemical aspects of insulin-like growth factors I and II in the bovine corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 445-451.
- Antoniazzi, A.Q., Webb, B.T., Romero, J.J., Ashley, R.L., Smirnova, N.P., Henkes, L.E., Bott, R.C., Oliveira, J.F., Niswender, D., Bazer, F.W. & Hansen, T.R. (2013). Endocrine delivery of interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin F<sub>2</sub> α-induced luteolysis in ewes. *Biology of Reproduction*, 88 (6):114, 1-12.
- Arosh, J.A., Banu, S.K. & McCracken, J.A. (2016). Novel concepts on the role of prostaglandins on luteal maintenance and maternal recognition and establishment of pregnancy in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 99 (7), 5926-5940.
- Atkins, J. A., Smith, M.F., MacNeil, M.D., Jinks, E.M., Abreu, F.M., Alexander, L.J. & Geary, T.W. (2013). Pregnancy establishment and maintenance in cattle. *Journal of Animal Science*, 91, 722-733.
- Auletta, F.J. & Flint, A.P.F (1988). Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, nonhuman primates, and women especially in relation to the time of luteolysis. *Endocrine Reviews*, 9 (1), 88-105.
- Ayad, A., Touati, K., Iguer-Ouada, M. & Benbarek, H. (2012). Different factors affecting the embryonic mortality in cattle. *Research and Opinions in Animal & Veterinary Opinions*, 2 (11), 559-572.
- Baez, G.M., Trevisol, E., Barletta, R.V., Cardoso, B.O., Ricci, A., Guenthera, J.N., Cummings, N.E., Wiltbank, M.C. (2017). Proposal of a new model for CL regression or maintenance during pregnancy on the basis of timing of regression of contralateral, accessory CL in pregnant cows. *Theriogenology*, 89, 214-255.

- Banu, S.K., Arosh, J.A., Chapdelaine, P. & Fortier, M.A. (2003). Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: A basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10 (20), 11747-11752.
- Bao, B. & Garverick, H.A. (1998). Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal of Animal Science*, 76, 1903-1921.
- Bauersch, S., Ulbrich, S.E., Reichenbach, H.D., Reichenbach, M., Büttner, M., Meyer, H.H.D., Spencer, T.E., Minten, M., Sax, G., Winter, G. & Wolf, E. (2012). Comparison of the effects of early pregnancy with human interferon, alpha 2 (IFNA2), on gene expression in bovine endometrium. *Biology of Reproduction*, 86 (2), 1-15.
- Bazer, F.W., Kim, J., Song, G., Satterfield, M.C., Johnson, G.A., Burghardt, R.C. & Wu, G. (2012). Uterine environment and conceptus development in ruminants. *Animal Reproduction*, 9 (3), 297-304.
- Bazer, F.W., Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C. & Wu, G. (2009). Comparative aspects of implantation. *Reproduction*, 138, 195-209.
- Bazer, F.W., Wu, G., Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C. & Bayless, K. (2010). Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Molecular Human Reproduction*, 16 (3), 135-152.
- Beard, A.P. & Lamming, G.E. (1994). Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF<sub>2α</sub> release in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100, 469-475.
- Beindorff, N., Nagai, K., Shirasuna, K., Herzog, K., Hoeffmann, K., Sasaki, M., Bollwein, H. & Miyamoto, A. (2010). Vascular changes in the corpus luteum during early pregnancy in the cow. *Journal of Reproduction and Development*, 56 (2), 263-270.
- Belfiore, C.J., Hawkins, D.E., Wiltbank, M.C. & Niswender, G.D. (1994). Regulation of cytochrome P450<sub>scc</sub> synthesis and activity in the ovine corpus luteum. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 51 (5/6), 283-290.
- Benyo, D.F. & Pate, J.L. (1992). Tumor necrosis factor-α alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology*, 130 (2), 854-860.
- Berg, D.K., van Leeuwen, J., Beaumont, S., Berg, M. & Pfeffer, P.L. (2010). Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology*, 73, 250-260.
- Berisha, B. & Schams, D. (2005). Ovarian function in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, 29, 305-317.
- Berisha, B., Schams, D., Kosmann, M., Amselgruber, W. & Einspanier, R. (2000). Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction*, 63, 1106-1114.
- Braden, T.D., Gamboni, F. & Niswender, G.D. (1988). Effects of prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 39, 245-253.
- Breukelman, S.P., Perényi, Z., Taverne, M.A.M., Jonker, H., van der Weijden, G.C., Vos, P.L.A.M., de Ruigh, L., Dieleman, S.J., Beckers, J.F. & Szenci, O. (2012). *The Veterinary Journal*, 194, 71-76.

- Bridges, G.A., Mussard, M.L., Burke, C.R. & Day, M.L. (2010). Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Animal Reproduction Science*, 117, 208-215.
- Bridges, P.J., Wright, D.J., Buford, W.I., Ahmad, N., Hernandez-Fonseca, H., McCormick, M.L., Schrick, F.N., Dailey, R.A., Lewis, P.E. & Inskeep, E.K. (2000). Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. *Journal of Animal Science*, 78 (11), 2942-2949.
- Brooks, K., Burns, G. & Spencer, T.E. (2014). Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5, 53-65.
- Bruno, J.B., Matos, M.H.T., Chaves, R.N., Celestino, J.J.H., Saraiva, M.A.V., Lima-Verde, I.B., Araújo, V.R. & Figueiredo, J.R. (2009). Angiogenic factors and ovarian follicle development. *Animal Reproduction*, 6 (2), 371-379.
- Campbell, B.K. (2009). The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Animal Reproduction*, 6 (1), 159-171.
- Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L. & Robalo Silva, J. (2002). Plasma progesterone profiles and factor affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, 58, 51-59.
- Choi, Y., Johnson, G.A., Spencer, T.E. & Bazer, F.W. (2003). Pregnancy and interferon tau regulate major histocompatibility complex class I and  $\beta_2$ -microglobulin expression in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, 68, 1703-1710.
- Clemente, M., de La Fuente, J., Fair, T., Al Naib, A., Gutierrez, A., Roche, J.F., Rizos, D. & Lonergan, P. (2009). Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction*, 138, 507-517.
- Davis, J.S., Alila, H.W., West, L.A., Corradino, R.A. & Hansel, W. (1988). Acute effects of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  on inositol phospholipid hydrolysis in the large and small cells of the bovine corpus luteum. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 58, 43-50.
- De Vries, A., Bartolome, J. & Broaddus, B. (2005). What is early pregnancy diagnosis worth? *Proceedings 2<sup>nd</sup> Florida Dairy Road Show*, 31-40.
- DesCôteaux, L., Carrière, P.D. & Durocher, J. (2006). Ultrasonography of the reproductive system of the cow: basic principles, practical uses and economic aspects of this diagnostic tool in dairy production. *World Buiatrics Congress*, Nice, França.
- Dickinson, S.E., Geary, T.W., Monning, J.M., Pohler, K.G., Green, J.A. & Smith, M.F. (2016). Effect of preovulatory follicle maturity on pregnancy establishment in cattle: the role of oocyte competence and the maternal environment. *Animal Reproduction*, 13 (3), 209-216.
- Dorniak, P. & Spencer, T.E. (2013). Biological roles of progesterone, prostaglandins, and interferon tau in endometrial function and conceptus elongation in ruminants. *Animal Reproduction*, 10 (3), 239-251.
- Dorniak, P., Thomas, H.W.Jr., Bazer, F.W. & Spencer, T.E. (2013). Cortisol and interferon tau regulation of endometrial function and conceptus development in female sheep. *Endocrinology*, 154 (2), 931-941.
- Echternkamp, S.E., Cushman, R.A. & Allan, M.F. (2009). Size of ovulatory follicles in cattle expressing multiple ovulations naturally and its influence on corpus luteum development and fertility. *Journal of Animal Science*, 87, 3556-3568.



- Farin, C.E., Imakawa, K., Hansen, T.R., McDonnell, J.J., Murphy, C.N., Farin, P.W. & Roberts, R.M. (1990). Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biology of Reproduction*, 43, 210-218.
- Fields, M.J. & Fields, P.A. (1996). Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*, 45, 1295-1325.
- Ford, S.P. & Chenault, J.R. (1981). Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrous cycle and early pregnancy. *Journals of Reproduction & Fertility*, 62, 555-562.
- Forde, N., Beltman, M.E., Duffy, G.B., Duffy, P., Mehta, J.P., Ó'Gaora, P., Roche, J.F., Lonergan, P. & Crowe, M.A. (2011). Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biology of Reproduction*, 84, 266-278.
- Forde, N., Duffy, G.B., McGettigan, P.A., Browne, J.A., Mehta, J.P., Kelly, A.K., Mansouri-Attia, N., Sandra, O., Loftus, B.J., Crowe, M.A., Fair, T., Roche, J.F., Lonergan, P. & Evans, A.C.O. (2012). Evidence for an early endometrial response to pregnancy in cattle: both dependent upon and independent of interferon tau. *Physiol Genomics*, 44, 799-810.
- Forde, N. & Lonergan, P. (2012). Transcriptomic Analysis of the Bovine Endometrium: What is Required to Establish Uterine Receptivity to Implantation in Cattle? *Journal of Reproduction and Development*, 58 (2), 189-195.
- Fricke, P.M. & Lamb, G.C. (2005). Potential applications and pitfalls of reproductive ultrasonography in bovine practice. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 21, 419-436.
- Fricke, P.M. & Wiltbank, M.C. (1999). Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology*, 52, 1133-1143.
- Gábor, G.F., Tóth, F., Ózsvári, L., Abonyi-Tóth, Z. & Sasser, R.G. (2008). Factors influencing pregnancy rate and late embryonic loss in dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 53-58.
- Galvão, A.M., Ferreira-Dias, G. & Skarzynski, D.J. (2013). Cytokines and angiogenesis in the corpus luteum. *Mediators of Inflammation*, 2013, 1-11.
- Garverick, H.A., Zollers, W.R. & Smith, M.F. (1992). Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Animal Reproduction Science*, 28, 111-124.
- Geary, T. (2005). Management strategies to reduce embryonic loss. *Range beef cow symposium*, 36, 69-78.
- Gifford, C.A., Racicot, K., Clark, D.S., Austin, K.J., Hansen, T.R., Lucy, M.C., Davies, C.J. & Ott, T.L. (2007). Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 274-280.
- Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R. & Kot, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, 55, 1187-1194.
- Giordano, J.O., Guenther, J.N., Lopes, G.Jr. & Fricke, P.M. (2012). Changes in serum pregnancy-associated glycoprotein, pregnancy-specific protein B, and progesterone concentrations before and after induction of pregnancy loss in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95 (2), 683-697.

- Godkin, J.D., Lifsey, B.J. & Gillespie, B.E. (1988). Characterization of bovine conceptus proteins produced during the peri- and postattachment periods of early pregnancy. *Biology of Reproduction*, 38, 703-711.
- Goff, A.K. (2004). Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 71, 11-16.
- Gospodarowicz, J.C., Lui, G.M., Baird, A., Esch, F. & Bohlen, P. (1985). Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology*, 117, 2283-2391.
- Hanzen, C.H., Pieterse, M., Scenczi, O. & Drost, M. (2000). Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation *per rectum*. *The Veterinary Journal*, 159, 161-170.
- Herzog, K., Brockhan-Lüdemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H. & Bollwein, H. (2010). Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology*, 73, 691-697.
- Hojo, T., Oda, A., Lee, S.H., Acosta, A.J. & Okuda, K. (2010). Effects of tumor necrosis factor and interferon on the viability and mRNA expression of TNF receptor type I in endothelial cells from the bovine corpus luteum. *Journal of Reproduction and Development*, 56 (5), 515-519.
- Hommeida, A., Nakao, T. & Kubota, H. (2004). Luteal function and conception in lactating cows and some factors influencing luteal function after first insemination. *Theriogenology*, 62, 217-225.
- Humblot, P. (2001). Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determining the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology*, 56, 1417-1433.
- Inskeep, E.K. & Dailey, R.A. (2005). Embryonic Death in Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 21, 437-461.
- Jenkin, G. & Young, I.R. (2004). Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 567-581.
- Jiemtaweeboon, S., Shirasuna, K., Nitta, A., Kobayashi, A., Schuberth, H.J., Shimizu, T. & Miyamoto, A. (2011). Evidence that polymorphonuclear neutrophils infiltrate into the developing corpus luteum and promote angiogenesis with interleukin-8 in the cow. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 79-89.
- Johnson, A.L. & Bridge, J.T. (2002). Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction*, 124, 19-27.
- Jonker, F.H. (2004). Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 415-430.
- Juengel, J.L., Nett, T.M., Tandeski, T.R., Eckery, D.C., Sawyer, H.R. & Niswender, G.D. (1995). Effects of luteinizing hormone and growth hormone on luteal development in hypophysectomized ewes. *Endocrine*, 3, 323-326.
- Juengel, J.L., Wiltbank, M.C., Meberg, B.M. & Niswender, G.D. (1996). Regulation of steady-state concentrations of messenger ribonucleic acid. *Biology of Reproduction*, 54, 1096-1102.

- Kastelic, J.P., Bergfelt, D.R. & Ginther, O.J. (1990). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, 33 (6), 1269-1278.
- Kastelic, J.P., Northey, D.L. & Ginther, O.J. (1990). Spontaneous embryonic death on days 20 to 40 in heifers. *Theriogenology*, 35 (2), 351-363.
- Kastelic, J.P., Pierson, R.A. & Ginther, O.J. (1990). Ultrasonic morphology of corpora lutea and central cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology*, 34 (3), 487-498.
- Kenyon, A.G., Mendonça, L.G.D., Lopes, G.Jr., Lima, J.R., Santos, J.E.P. & Chebel, R.C. (2013). Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 136, 223-230.
- Kim, S., Choi, Y., Spencer, T.E. & Bazer, F.W. (2003). Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 58-67.
- Klagsbrun, M. & D'Amore, P. (1991). Regulators of angiogenesis. *Annual Review of Physiology*, 53, 217-239.
- Kobayashi, S., Miyamoto, A., Berisha, B. & Schams, D. (2001). Growth hormone, but not luteinizing hormone, acts with luteal peptides on prostaglandin F<sub>2α</sub> and progesterone secretion by bovine corpora lutea *in vitro*. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 63, 79-92.
- Kombé, A., Sirois, J. & Goff, A.K. (2003). Prolonged progesterone treatment of endometrial epithelial cells modifies the effect of estradiol on their sensitivity to oxytocin. *Steroids*, 68, 651-658.
- Korzekwa, J.A., Okuda, K., Woclawek-Potocka, I., Murakami, S. & Skarzynski, D.J. (2006). Nitric oxide induces apoptosis in bovine luteal cells. *Journal of Reproduction and Development*, 52 (3), 353-361.
- Korzekwa, J.A., Jaroszewski, J.J., Woclawek-Potocka, I., Bah, M.M. & Skarzynski, D.J. (2008). Luteolytic effect of prostaglandin F<sub>2α</sub> on bovine corpus luteum depends on cell composition and contact. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 464-472.
- Korzekwa, J.A., Bodek, G., Bukowska, J., Blitek, A. & Skarzynski, D. (2011). Characterization of bovine immortalized luteal endothelial cells: action of cytokines on production and content of arachidonic acid metabolites. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 27-35.
- Lamming, G.E. & Mann, G.E. (1995). Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F<sub>2α</sub> production in cows by progesterone and oestradiol. *Journal of Reproduction and Fertility*, 103, 69-73.
- Lee, J., McCracken, J.A., Banu, S.K., Rodriguez, R., Nithy, T.K. & Arosh, J.A. (2010). Transport of prostaglandin F<sub>2α</sub> pulses from the uterus to the ovary at the time of luteolysis in ruminants is regulated by prostaglandin transporter-mediated mechanisms. *Endocrinology*, 151 (7), 3326-3335.
- Lee, J., McCracken, J.A., Stanley, J.A., Nithy, T.K., Banu, S.K. & Arosh, J.A. (2012). Intraluteal prostaglandin biosynthesis and signaling are selectively directed towards PGF<sub>2α</sub> during luteolysis but towards PGE<sub>2</sub> during the establishment of pregnancy in sheep. *Biology of Reproduction*, 87 (4), 1-14.
- Leung, S.T. & Wathes, D.C. (2000). Oestradiol regulation of oxytocin receptor expression in cyclic bovine endometrium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 119, 287-292.

- Lonergan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, 76 (9), 1594-1601.
- Lonergan, P. (2015). New insights into the function of progesterone in early pregnancy. *Animal Frontiers*, 5 (1), 12-17.
- Lonergan, P., Fair, T., Forde, N. & Rizos, D. (2016). Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 86, 270-277.
- Lonergan, P., Forde, N. & Spencer, T.E. (2016a). Progesterone and conceptus-derived factors important for conceptus survival and growth. *Animal Reproduction*, 13 (3), 143-152.
- Lonergan, P., Forde, N. & Spencer, T.E. (2016b). Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 28, 66-74.
- Lonergan, P., O'Hara, L. & Forde, N. (2013). Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. *Animal Reproduction*, 10 (3), 223-227.
- Lopez, H., Caraviello, D.Z., Satter, L.D., Fricke, P.M. & Wiltbank, M.C. (2005). Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88 (8), 2783-2793.
- López-Gatius, F., Santolaria, P., Yániz, J., Rutllant, J. & López-Béjar, M. (2002). Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology*, 57, 1251-1261.
- López-Gatius, F., López-Béjar, M., Fenech, M. & Hunter, R.H.F. (2005). Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. *Theriogenology*, 63, 1298-1307.
- Lucy, M.C. (2001). Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science*, 84, 1277-1293.
- Lucy, M.C., Collier, R.J., Kitchell, M.L., Dibner, J.J., Hauser, S.D. & Krivi, G.G. (1993). Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biology of Reproduction*, 48, 1219-1227.
- Lukaszewska, J. & Hansel, W. (1980). Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow. *Journals of Reproduction & Fertility*, 59, 485-493.
- Lüttgenau, J., Ulbrich, S.E., Beindorff, N., Honnens, A., Herzog, K. & Bollwein, H. (2011). Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 125, 20-29.
- Lynch, K., Fernandez, G., Pappalardo, A. & Peluso, J.J. (2000). Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating intracellular free calcium levels through a protein kinase C $\delta$ -Dependent Pathway. *Endocrinology*, 141 (11), 4209-4217.
- Mamluk, R., Chen, D., Greber, Y., Davis, J.S. & Meidan, R. (1998). Characterization of messenger ribonucleic acid expression for prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  and luteinizing hormone receptors in various bovine luteal cells types. *Biology of Reproduction*, 58, 849-856.
- Mann, G.E. & Lamming, G.E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, 121, 175-180.

- Mann, G.E. & Lamming, G.E. (2000). The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. *Animal Reproduction Science*, 64, 171-180.
- Mann, G.E., Robinson, R.S., Hunter, M.G. (2007). Corpus luteum size and function following single and double ovulations in non-lactating dairy cows. *Theriogenology*, 67, 1256-1261.
- Maroni, D. & Davis, J.S. (2011). TGF $\beta$ 1 disrupts the angiogenic potential of microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Journal of Cell Science*, 124 (14), 2501-2510.
- Martin, I. & Ferreira, C.P.F. (2009). Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. *Veterinária e Zootecnia*, 16 (2), 270-279.
- Matsumoto, H., Ma, W., Daikoku, T., Zhao, X., Paria, B.C., Das, S.K., Trzaskos, J.M. & Dey, S.K. (2002). Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (32), 29260-29267.
- McCracken, J.A., Custer, E.E., Eldering, J.A. & Robinson, A.G. (1996). The central oxytocin pulse generator: a pacemaker for the ovarian cycle. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 56, 819-832.
- Mihm, M., Baguisi, A., Boland, M.P. & Roche, J.F. (1994). Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102, 123-130.
- Milvae, R.A. (2000). Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F $_{2\alpha}$  in corpus luteum function. *Reviews of Reproduction*, 5, 1-5.
- Miyamoto, A., Kobayashi, S., Arata, S., Ohtani, M., Fukui, Y. & Schams, D. (1997). Prostaglandin F $_{2\alpha}$  promotes the inhibitory action of endothelin-1 on the bovine luteal function *in vitro*. *Journal of Endocrinology*, 152, R7-R11.
- Moncada, S. & Erusalimsky, J.D. (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature*, 3, 214-220.
- Moore, S.G., Scully, S., Browne, J.A., Fair, T. & Butler, S.T. (2014). Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: V. Factors affecting circulating progesterone concentrations. *Journal of Dairy Science*, 97 (9), 5543-5557.
- Mussard, M.L. (2009). Influence of the size and age of the ovulatory follicle on fertility in beef cattle. *Doctor of philosophy dissertation*. Ohio: Graduate Program in Animal Science, The Ohio State University.
- Nagata, S. & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, 267, 1449-1456.
- Nakamura, T. & Sakamoto (2001). Reactive oxygen species up-regulates cyclooxygenase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284, 203-210.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y. & Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological Reviews*, 79 (4), 1193-1226.
- Neuvians, T.P., Pfaffl, M.W., Berisha, B. & Schams, D. (2003). The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. *Domestic Animal Endocrinology*, 25, 359-372.
- Neuvians, T.P., Schams, D., Berisha, B. & Pfaffl, M.W. (2004). Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor

- in prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 70, 473-480.
- Nguyen, P.T.T., Conley, A.J., Soboleva, T.K. & Lee, R.S.F. (2012). Multilevel regulation of steroid synthesis and metabolism in the bovine placenta. *Molecular Reproduction and Development*, 79, 239-254.
- Niswender, G.D. (2002). Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, 123, 333-339.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., McGuire, W.J., Belfiore, C.J. & Wiltbank, M.C. (1994). Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction*, 50, 239-247.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K. & McIntush, E.W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, 80 (1), 1-29.
- Niswender, G.D., Davis, T.L., Griffith, R.J., Bogan, R.L., Monser, K., Bott, R.C., Bruemmer, J.E. & Nett, T.M. (2007). Judge, jury and executioner: the auto-regulation of luteal function. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 64, 191-206.
- Nothnick, W.B. & Pate, J.L. (1990). Interleukin-1 $\beta$  is a potent stimulator of prostaglandin synthesis in bovine luteal cells. *Biology of Reproduction*, 43, 898-903.
- Okuda, K., Korzekwa, A., Shibaya, M., Murakami, S., Nishimura, R., Tsubouchi, M., Woclawek-Potocka, I. & Skarzynski, D.J. (2004). Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biology of Reproduction*, 71, 2065-2071.
- O'Shea, J.D., Rodgers, R.J. & D'Occhio, M.J. (1989). Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *Journals of Reproduction & Fertility*, 85, 483-487.
- Otani, A., Takagi, H., Oh, H., Suzuma, K., Matsumura, M., Ikeda, E. & Yoshihito, H. (2000). Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41 (5), 1192-1199.
- Pate, J.L. & Condon, W.A. (1982). Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultered bovine luteal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 28, 551-562.
- Pate, J.L., Johnson-Larson, C.J. & Ottobre, J.S. (2012). Life or death decisions in the corpus luteum. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (4), 197-303.
- Penny, L.A., Armstrong, D., Bramley, T.A., Webb, R., Collins, R.A. & Watson, E.D. (1999). Immune cells and cytokine production in the bovine corpus luteum throughout the oestrous cycle and after induced luteolysis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 155, 87-96.
- Pereira, G.S. (2013). *Estudo ultrassonográfico de alguns aspectos da dinâmica ovárica em vacas da raça Frísia Holstein sujeitas a vários protocolos de indução de ovulação*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Perry, G.A., Michael, F.S., Lucy, M.C., Jonathan A. Green, J.A., Tina E. Parks, T.E., MacNeil, M.D., Roberts, A.J. & Geary, T.W. (2005). Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (14), 5268-5273.
- Pescador, N., Stocco, D.M. & Murphy, B.D. (1999). Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. *Biology of Reproduction*, 60, 1453-1461.

- Peters, N.W. & Pursley, J.R. (2002). Fertility of lactating dairy cows treated with ovsynch after presynchronization injections of PGF<sub>2α</sub> and GnRH. *Journal of Dairy Science*, 85 (9), 2403-2406.
- Peters, M.W. & Pursley, J.R. (2003). Timing of final GnRH of the ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology*, 60, 1197-1204.
- Petroff, M.G., Petroff, B.K. & Pate, J.L. (2001). Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells. *Reproduction*, 121, 753-760.
- Pohler, K.G., Geary, T.W., Johnson, C.L., Atkins, J.A., Jinks, E.M., Busch, D.C., Green, J.A., MacNeil, M.D. & Smith, M.F. (2013). Circulating bovine pregnancy associated glycoproteins are associated with late embryonic/fetal survival but not ovulatory follicle size in suckled beef cows. *Journal of Animal Science*, 91 (9), 4158-4167.
- Pohler, K.G., Pereira, M.H.C., Lopes, F.R., Lawrence, J.C., Keisher, D.H., Smith, M.F., Vasconcelos, J.L.M. & Green, J.A. (2016). Circulating concentrations of bovine pregnancy-associated glycoproteins and late embryonic mortality in lactating dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 99, 1-11.
- Poole, D.H. & Pate, J.L. (2012). Luteal microenvironment directs resident T lymphocyte function in cows. *Biology of Reproduction*, 86 (2), 1-10.
- Poore, K.R., Young, I.R., Canny, B.J. & Thorburn, G.D. (1998). Studies on the role of ACTH in the regulation of adrenal responsiveness and the timing of parturition in the ovine fetus. *Journal of Endocrinology*, 158, 161-171.
- Pugliesi, G., Beg, M.A., Carvalho, G.R. & Ginther, O.J. (2012). Induction of PGFM pulses and luteolysis by sequential estradiol-17β treatments in heifers. *Theriogenology*, 77, 292-506.
- Quintela, L.A., Barrio, M., Penã, A.I., Becerra, J.J., Cainzos, J., Herradón, P.G. & Díaz, C. (2012). Use of ultrasound in the reproductive management of dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (3), 34-44.
- Redmer, D.A., Reynolds, L.P. (1996). Angiogenesis in the ovary. *Reviews of Reproduction*, 1, 182-192.
- Reynolds, L., Grazul-Bilska, A.T. & Redmar, D.A. (2000). Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine*, 12 (1), 1-9.
- Rhinehart, J.D., Starbuck-clemmer, M.J., Flores, J.A., Milvae, R.A., Yao, J., Poole, D.H. & Inskeep, E.K. (2009). Low peripheral progesterone and late embryonic/early fetal loss in suckled beef and lactating dairy cows. *Theriogenology*, 71, 480-490.
- Ribeiro, E.S., Monteiro, A.P.A., Bisinotto, R.S., Lima, F.S., Greco, L.F., Ealy, A.D., Thatcher, W.W. & Santos J.E.P. (2016). Conceptus development and transcriptome at preimplantation stages in lactating dairy cows of distinct genetic groups and estrous cyclic statuses. *Journal of Dairy Science*, 99 (6), 4761-4777.
- Roberts, W.G. & Palade, G.E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Cell Science*, 108, 2369-2379.
- Robinson, R.S., Mann, G.E. & Lamming, G.E. (1999). The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *Journal of Endocrinology*, 160, 21-30.

- Robinson, R.S., Mann, G.E., Lamming, G.E. & Wathes, D.C. (2001). Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrus cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, 122, 965-979.
- Royal, M.D., Darwash, A.O., Flint, A.P.F., Webb, R., Woolliams, J.A. & Lamming, G.E. (2000). Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Animal Science*, 70, 487-501.
- Rueda, B.R., Tilly, K.I., Botros, I.W., Jolly, P.D., Hansen, T.R., Hoyer, P.B. & Tilly, J.L. (1997). Increased bax and interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. *Biology of Reproduction*, 56, 186-193.
- Sá Filho, O.G., Meneghetti, M., Peres, R.F.G., Lamb, G.C. & Vasconcelos, J.L.M. (2009). Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, 72, 210-218.
- Saacke, R.G., Dalton, J.C., Nadir, S., Nebel, R.L. & Bame, J.H. (2000). Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 663-677.
- Sakumoto, R., Vermehren, M., Kenngott, R.A., Okuda, K. & Sinowatz, F. (2011). Localization of gene and protein expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$  and tumor necrosis factor receptor types I and II in the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Journal of Animal Science*, 89, 3040-3047.
- Sakumoto, R., Hayashi, K.G., Fujii, S., Kanahara, H., Hosoe, M., Furusawa, T. & Kizaki, K. (2017). Possible roles of CC- and CXC-chemokines in regulating bovine endometrial function during early pregnancy. *Internacional jornal of molecular sciences*, 18, 742-758.
- Sandhoff, T.W. & McLean, M.P. (1996). Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  reduces steroidogenic acute regulatory (StAR) protein messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary. *Endocrine*, 5 (2), 183-190.
- Sangsritavong, S., Combs, D.K., Sartori, R., Armentano, L.E. & Wiltbank, M.C. (2002). High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 $\beta$  in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85 (11), 2831-2842.
- Santos, J.E.P., Bisinotto, R.S. & Ribeiro, E.S. (2016). Mechanisms underlying reduced fertility in anovular dairy cows. *Theriogenology*, 86, 254-262.
- Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Chebel, R.C., Cerri, R.L.A. & Galvão, K.N. (2004). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 513-535.
- Sartori, R., Haughian, J.M., Shaver, R.D., Rosa, G.J.M. & Wiltbank, M.C. (2004). Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 87 (4), 905-920.
- Sartori, R., Rosa, G.J.M. & Wiltbank, M.C. (2002). Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, 85 (11), 2813-2822.
- Sawyer, H.R., Niswender, K.D., Branden, T.D. & Niswender, G.D. (1990). Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . *Domestic Animal Endocrinology*, 7 (2), 229-238.
- Schams, D. & Berisha, B. (2004). Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. *Reproduction in Domestic Animals*, 39, 241-251.



- Schams, D., Berisha, B., Neuvians, T., Amselgruber, W. & Kraetzl, W.D. (2003). Real-time changes of the local vasoactive peptide systems (angiotensin, endothelin) in the bovine corpus luteum after induced luteal regression. *Molecular Reproduction and Development*, 65, 57-66.
- Schemms, S.R., Deaver, D.R., Griel, L.C. & Muller, L.D. (1990). Effects of recombinant bovine somatotrophin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. *Biology of Reproduction*, 42, 815-821.
- Schwall, R.H., Sawyer, H.R. & Niswender, G.D. (1986). Differential regulation by LH and prostaglandins of steroidogenesis in small and large luteal cells of the ewe. *Journals of reproduction & Fertility*, 76, 821-829.
- Scully, S., Evans, A.C.O., Carter, F., Duffy, P., Lonergan, P. & Crowe, M.A. (2015). Ultrasound monitoring of blood flow and echotexture of the corpus luteum and uterus during early pregnancy of beef heifers. *Theriogenology*, 83, 449-458.
- Shelton, K., Parkinson, T.J., Hunter, M.G., Kelly, R.W. & Lamming, G.E. (1990). Prostaglandin E-2 as a potential luteotrophic agent during early pregnancy in cattle. *Journals of Reproduction & Fertility*, 90, 11-17.
- Shimizu, T., Kaji, A., Murayama, C., Magatab, F., Shirasuna, K., Wakamiyac, K., Okudac, K. & Miyamoto, A. (2012). Effects of interleukin-8 on estradiol and progesterone production by bovine granulosa cells from large follicles and progesterone production by luteinizing granulosa cells in culture. *Cytokine*, 57, 175-181.
- Shirasuna, K., Jiemtaweeboon, S., Raddatz, S., Nitta, A., Schuberth, H.J., Heinrich Bollwein, H., Shimizu, T. & Miyamoto, A. (2012). Rapid accumulation of polymorphonuclear neutrophils in the corpus luteum during PGF<sub>2α</sub>-induced luteolysis in the cow. *PLoS ONE*, 7 (1), e29054- e29054.
- Shirasuna, K., Matsumoto, H., Matsuyama, S., Kimura, K., Bollwein, H. & Miyamoto, A. (2015). Possible role of interferon tau on the bovine corpus luteum and neutrophils during the early pregnancy. *Reproduction*, 150, 217-225.
- Silva, L.A. & Ginther, O.J. (2010). Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. *Reproduction*, 139, 453-463.
- Silva, P.J., Juengel, J.L., Rollyson, M.K. & Niswender, G.D. (2000). Prostaglandin metabolism in the ovine corpus luteum: catabolism of prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) coincides with resistance of the corpus luteum to PGF<sub>2α</sub>. *Biology of Reproduction*, 63, 1229-1236.
- Silvia, W.J., Lewis, G.S., McCracken, J.A., Thatcher, W.W. & Wilson, L. Jr. (1991). Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F<sub>2α</sub> during luteolysis in ruminants. *Biology of Reproduction*, 45, 655-663.
- Singh, J., Pierson, R. A. & Adams, G. P. (1997). Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109, 35-44.
- Siqueira, L.G.B., Torresa, C.A.A., Amorim, L.S., Souza, E.D., Camargo, C.A.C., Fernandes, C.A.C. & Viana, J.H.M.V. (2009). Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 115, 18-28.
- Skarzynski, J.D., Jaroszewski, J.J. & Okuda, K. (2001). Luteotropic mechanisms in the bovine corpus luteum: role of oxytocin, prostaglandin F<sub>2α</sub>, progesterone and noradrenaline. *Journal of Reproduction and Development*, 47 (3), 125-137.

- Skarzynski, J.D. & Okuda, K. (2000). Different actions of noradrenaline and nitric oxide on the output of prostaglandins and progesterone in cultured bovine luteal cells. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 60, 35-47.
- Spencer, T.E., Forde, N., Dorniak, P., Hansen, T.R., Romero, J.J. & Lonergan, P. (2013). Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. *Reproduction*, 146, 377-387.
- Spencer, T.E., Forde, N. & Lonergan, P. (2015). The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 99, 5941-5950.
- Starbuck, M.J., Dailey, R.A. & Inskeep, E.K. (2004). Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. *Animal reproduction science*, 84, 27-39.
- Stocco, C., Telleria, C. & Gibori, G. (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews*, 28 (1), 117-149.
- Stojovik, M., Wolf, E., Büttner, M., Berg, U., Charpigny, G., Schmitt, A. & Brem, G. (1995). Secretion of biologically active interferon tau by in vitro-derived bovine trophoblastic tissue. *Biology of Reproduction*, 53, 1500-1507.
- Sugino, N. & Okuda, K. (2007). Species-related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. *Journal of Reproduction and Development*, 53 (5), 977-986.
- Sugino, N., Suzuki, T., Kashida, S., Karube, A., Takiguchi, S. & Kato, H. (2000). Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85 (11), 4379-4386.
- Talbott, H., Delaney, A., Zhang, P., Yu, Y., Cushman, R.A., Cupp, A.S., Hou, X. & Davis, J.S. (2014). Effects of IL8 and immune cells on the regulation of luteal progesterone secretion. *Reproduction*, 148, 21-31.
- Tanaka, J., Acosta, T.J., Berisha, B., Tetsuka, M., Matsui, M., Kobayashi, S., Schams, D. & Miyamoto, A. (2004). Relative changes in mRNA expression of angiopoietins and receptors Tie in bovine corpus luteum during estrous cycle and prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced luteolysis: a possible mechanism for the initiation of luteal regression. *The Journal of Reproduction and Development*, 50 (6), 619-626.
- Taniguchi, H., Yokomizu, Y. & Okuda, K. (2002). Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 66, 754-759.
- Tenhagen, B-A., Wittke, M., Drillich, M. & Heuwieser, W. (2003). Timing of ovulation and conception rate in primiparous and multiparous cows after synchronization of ovulation with GnRH and PGF<sub>2α</sub>. *Reproduction in Domestic Animals*, 38, 451-454.
- Tenhagen, B-A., Surholt, R., Wittke, M., Vogel, C., Drillich, M. & Heuwieser, W. (2004). Use of Ovsynch in dairy herds - differences between primiparous and multiparous cows. *Animal Reproduction Science*, 81, 1-11.
- Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T.R. & Pru, J.K. (2001). Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, 56, 1435-1450.
- Tomac, J., Ceknović, Đ & Arapović, J. (2011). Biology of the corpus luteum. *Periodicum Biologorum*, 113 (1), 43-49.

- Tsai, S.J & Wiltbank, M.C. (1998). Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biology of Reproduction*, 58, 346-352.
- Ulbrich, S.E., Schulke, K., Groebner, A.E., Reichenbach, H.D., C Angioni, C., G Geisslinger, G. & Meyer, H.H.D. (2009). Quantitative characterization of prostaglandins in the uterus of early pregnant cattle. *Reproduction*, 138, 371-382.
- Vanselow, J. & Furbass, R. (2010). Epigenetic control of folliculogenesis and luteinization. *Animal Reproduction*, 7 (3), 134-139.
- Vasconcelos, J.L.M, Sartori, R., Oliveira, H.N., Guenther, J.G. & Wiltbank, M.C. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56, 307-314.
- Vernunft, A., Weitzel, J.M. & Viergutz, T. (2013). *Corpus luteum* development and its morphology after aspiration of a preovulatory follicle is related to size and steroid content of the follicle in dairy cows. *Veterinarni Medicina*, 58 (4), 221-229.
- Vonnahme, K.A., Redmer, D.A., Borowczyk, E., Bilski, J.J., Luther, J.S., Johnson, M.L., Reynolds, L.P. & Grazul-Bilska, A.T. (2006). Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin  $F_{2\alpha}$ -induced regression in sheep. *Reproduction*, 131, 1115-1126.
- Watanabe, K., Yoshida, R., Shimizu, T. & Hayaishi, O. (1985). Enzymatic Formation of Prostaglandin  $F_2$ , from Prostaglandin  $H_2$  and  $D_2$ . Purification and properties of prostaglandin F synthetase from bovine lung. *The Journal of Biological Chemistry*, 260 (11), 7035-7041.
- Wathes, D.C., Smith, H.F., Leung, S.T., Stevenson, K.R., Meier, S. & Jenkin, G. (1996). Oxytocin receptor development in ovine uterus and cervix throughout pregnancy and at parturition as determined by *in situ* hybridization analysis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106, 23-31.
- Wijma, R., Stangaferro, M.L., Kamat, M.M., Vasudevan, S., Ott, T.L. & Giordano, J.O. (2016). Embryo mortality around the period of maintenance of the corpus luteum causes alterations to the ovarian function of lactating dairy cows. *Biology of Reproduction*, 95 (5), 112-126.
- Wiltbank, M.C. (1994). Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. *Journal of Animal Science*, 72, 1873-1883.
- Wiltbank, M.C., Belfiore, C.J. & Niswender, G.D. (1993). Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 97, 1-7.
- Wiltbank, M.C., Lopez, H., Sartori, R., Sangsritavong, S. & Gümen, A. (2006). Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 65, 17-29.
- Wiltbank, M.C., Souza, A.H., Carvalho, P.D., Cunha, A.P., Giordano, J.O., Fricke, P.M., Baez, G.M. & Diskin, M.G. (2014). Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal*, 8 (s1), 70-81.
- Wiltbank, M.C., Baez, G.M., Garcia-Guerra, A., Toledo, M.Z., Monteiro, P.L.J., Melo, L.F., Ochoa, J.C., Santos, J.E.P. & Sartori, R. (2016a). Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation on lactating dairy cows. *Theriogenology*, 86, 239-253.

- Wiltbank, M.C., Median, R., Ochoa, J., Baez, G.M., Giordano, J.O., Ferreira, J.C.P. & Sartori, R. (2016b). Maintenance or regression of the corpus luteum during multiple decisive periods of bovine pregnancy. *Animal Reproduction*, 13 (3), 217-233.
- Woad, K.J., Baxter, G., Hogg, C.O., Bramley, T.A., Webb, R. & Armstrong, D.G. (2000). Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120, 293-302.
- Wolfenson, D., Gil Inbar, G., Zvi Roth, Z., Moshe Kaim, M., Amir Bloch, A. & Ruth Braw-Tal, R. (2004). Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, 62, 1042-1055.
- Yancopoulos, G., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J. & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407, 242-248.
- Zalman, Y., Klipper, E., Farberov, S., Mondal, M., Wee, G., Folger, J.K., Smith, G.W. & Meidan, R. (2012). Regulation of angiogenesis-related prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced genes in the bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 86 (3), 1-10.

# Anexo 1

Tabela 24 - Tabela de registo de dados

Nº	Ordénio	DM	Dim	Área	Volume	WATP	D7	DM7	Dim7	A7	V7	D14	DM14	Dim14	V14	DM21	Dim21	A21	V21	D35	Cl	DM35	Dim35	A35	V35	D42	DM42	Dim42	A42	V42	D63	DM63	Dim63	A63	V63		
921	D	1.2	1	1.2	0.8	30.09	OD	2.5	1.7	3.7	4.5	OD	2.6	1.7	3.7	4	OD	3.5	2.1	5.6	7.8																
1013	E	2.1	1.3	2.2	1.8	30.09	OD	2.9	1.9	4.6	5.7	OD	2.3	0.9	1.7	1																					
1034	E	2.7	2.2	3.7	5.3	30.09	OE	3.4	1.5	4.4	5	OE	3.4	2.7	6.9	12	OE	3.5	2.1	6	8.7	POS ESQ	OE	4.3	2.4	9.1	15.8	OE	2.8	2.6	6.9	12	OE	2.6	1.7	3.8	4.1
1041	D	1.8	1.7	2.7	2.8	30.09	OD	2	1.9	3.7	4.7	OD	2.8	2.1	4.7	6.7	OD	2.6	1.5	3.1	3	NEG	OD	1.6	1.3	1.8	1.7										
389	D	2.8	2.1	3.7	7.5	30.09	OD	2.7	2.1	4.7	6.6	OD	2.5	2.1	4	5.3																					
1000	E	2.1	1.6	3	3.5	07.10	OE	1.8	1.7	2.2	1.7	OE	2.1	1.5	2.6	2.4	OE	2.6	1.9	5.7	7.3	POS ESQ	OE	2.5	1.7	3.6	4.3	OE	2.5	2.3	3.9	4.9	OE	3.4	2.5	6.1	9.7
1015						07.10	OE	2.3	1.6	3.8	4.4	OE	3.5	2	5.4	7	OE	2	1.9	2.8	3.2	NEG	OE	3.7	2.7	7.4	12.9										
607	D	1.1	0.7	1	0.7	07.10	OE	2.7	1.5	4.7	5.3	OE	2.5	1.6	3.3	3.8	OE	2.6	1.2	2.8	2.3	POS ESQ	OE	3	1.9	5	6.5	OE	2.8	2.1	4.9	6.6	OE	3.6	2.4	6.4	10.4
9102	D	2.2	3.2	5.2	7.5	07.10	OE	2.7	1.7	3.5	4.2	OE	3.2	1.7	4.5	5.6																					
548	E	1.5	1.4	2.3	2.6	14.10	OE	1.6	1.1	1.6	1.2																										
1033	E	2.2	1.1	2.2	1.8	14.10	OE	3.5	1.6	5.2	6.1	OE	3.8	1.9	4.6	4.8	OD	3	2.2	5.2	7.6	POS ESQ	OE	2.5	2	4.7	7.2	OE	2.6	2.1	4.3	5.8	OE	3	1.8	4.6	5.7
700	D	1.3	1.2	1.4	1.3	14.10	OD	2.5	1.9	3.9	5.2	OD	3.5	2.1	5.8	7.9	OD	2.7	1.6	5	6.7	NEG	OD	3.2	1.1	2.9	2										
101	D	1.4	0.7	1	0.6	14.10	OD	6.5	11.5	2.9	2.8	OD	3	1.7	4.4	4.8	OD	2.9	1.8	3.7	4.7	POS DTA	OD	1.7	1.7	2.1	2.2	OD	5.2	2.5	12.1	20.4	OD	3.4	1.7	5.1	6
9049	D	1.1	0.9	0.5	0.5	14.10	OD	3.1	2.5	6	10																										
1018	E	1.3	0.9	1	0.6	14.10	OE	4.2	2.6	9.3	16.5	OE	3.3	2.9	8.6	17.1	OE	3.8	2.2	6.7	8.9	POS ESQ	OE	3.5	3	8.5	15.9	OE	3.4	1.7	5	6.1					
1004	E	1	0.8	0.9	0.6	14.10																															
1001	D	2.2	1.3	2.7	2.4	21.10	OD	3.9	2.5	7.4	11.8	OD	2.3	1.6	3.2	3.4	OD	4.1	2.4	7.9	13																
932	D	1.2	0.8	0.8	0.4	28.10	OD	4.5	2.1	8.7	12.9	OD	4.1	1.3	6.5	8	OD	3	2.1	3.4	3.8	NEG	OD	2.3	2	4.2	5.1										
1089	D	1.5	1.2	1.6	1.3	28.10	OD	3.4	2.4	7.3	12	OD	2.9	1.5	3.8	3.9	OD	3	2.2	4.4	5.8	NEG	OD	1.7	1	1.6	1.1										
516	E	1.7	1.6	2.6	2.7	28.10	OD	2.4	1.6	2.9	3.2	OD	3.1	1.6	4.2	4.7	OD	3	1.6	4.2	4.8																
611	D	1.6	1.1	2.2	0.7	03.11	OD	3.4	2.3	5.8	8.5	OE	2.6	1.8	3.4	4.1	OE	2.2	2.1	4.1	5.6																
971	D	1.3	1.2	1	0.7	03.11	OD	3.4	1.6	4.1	4.2	OD	2.5	1.8	3.2	3.7	OD	2.5	1.3	3	2.8																
1110	D	1.4	1.2	1.2	0.9	03.11	OD	2.5	1.4	2.7	2.5	OD	2.9	1.8	4.2	4.8	OD	2.3	1.7	3.4	3.8	NEG	OD	2.1	1.8	3.1	3.6										
1113	D	1.5	0.8	1	0.4	03.11	OD	3.3	1.4	3.9	3.8	OD	2.6	1.3	3.4	3.3	OD	2.7	1.5	3.6	4	NEG	OD	1.8	1	1.5	1.1										
1115	E	2.6	2.2	5.3	8.3	03.11	OE	3.2	3.3	8.7	17.6	OD	4.4	6.2	20.3	53.4																					
646	D	1.2	1	1.1	0.7	03.11	OD	2.9	2.3	5.3	7.8																										
703	D	1.5	1.3	1.7	1.4	03.11	OD	2.4	1.5	3.2	4																										
1093	E	1.9	1.3	2.1	2	10.11	OD	3.1	2.3	7.4	12.7	OD	2.5	1.7	3.6	4.5	OD	2.9	1.9	3.9	4.9	POS DTA	OD	3	2.1	5.7	7.6	OD	3.6	2	6.5	9	OD	3.3	2.4	6.8	9.9
951	E	2.4	1.5	2.5	2.4	10.11	OE	3.5	2.2	5.8	7.8	OE	2.8	2.3	5.6	8.6	OE	4.5	2.8	9.5	18.6	NEG	OE	2.9	2	5.6	8.4										
1050	E	1.8	1.1	1.6	1.2	10.11	OE	4.8	1.6	6.3	6.8	OE	1.7	1.3	1.5	1.1	OE	2.3	2.3	1.6	1.6	NEG	OE	2.2	1.9	3.6	4.8										
1088	E	1.5	1.3	1.6	1.4	10.11	OE	3.1	1.5	3.8	3.6																										
1112	D	1.6	1.5	2	1.8	10.11	OD	2	1.4	2.4	2.2	OD	2.6	1	2	1.3	OD	2.2	1.7	3.2	3.6	NEG	OD	2.5	1.5	3.6	4										
232	D	1.2	0.9	1	0.7	10.11	OD	3.2	1.7	4.9	5.6	OD	3	2.2	5.3	7.4	OD	3	2.2	4.5	6																
8971	E	1.7	1.5	2.3	2.2	10.11	OE	2.7	2.2	4.6	6.4	OE	2.5	2.3	4.6	6.8	OE	2.7	2.4	5.7	9.1	NEG	OE	2.1	3.4	5	6.2										
9085	E	1.5	1.4	1.7	1.7	10.11	OE	3.2	2.4	6.9	10.5	OE	2.9	2	4.3	5.3	OE	2.3	2.3	3.1	4	NEG	OE	3.5	1.6	5	5.5										
363	E	1.2	1	1.4	1.1	10.11																															
426	D	1.2	0.8	0.2	0.5	10.11	OD	3.6	2.9	9.6	16.8	OD	3.4	2.1	7.7	11																					
541	E	2	2	3.2	4.2	10.11	OD	3.1	2.4	5.4	8.2	OD	3.2	1.6	4.8	5.9	OD	2.7	1.8	3.7	4.4	POS	OD	2.4	1.7	2.2	2	OD	2	1.5	4.1	5	OD	3.5	2.4	5.7	8.3
645	D	1.2	0.9	1.2	0.8	10.11	OD	3.1	2.4	6.5	9.8																										
204	E	1.3	1.1	0.9	0.5	18.11	OE	2.7	2.2	4.9	7.1	OE	3.2	2.1	5.5	8	OE	1.8	1.7	2.2	2.3																
8525	D	2.9	2.7	7.2	13	18.11	OD	4.5	3.2	11.7	24.8	OD	2.7	2.6	5.8	9.4	OD	3.1	2.4	7.3	13.5	POS	OD	3.1	2.4	6.4	9.8										
653	E	2.2	1.8	2.7	3.2	18.11	OE	4.9	4.5	19.1	61	OE	2.8	2.8	5.9	9.4	OE	1.9	1.3	1.8	1.4																
1063	D	1.4	1.2	0.9	0.6	18.11	OD	2.8	2.5	5.5	8.9	OD	3.7	1.9	6.1	7.7	OD	2.7	1.5	2.8	2.7																
1070	D	1.6	1.2	1.8	1.5	18.11	OD	3	1.4	3.7	3.4	OD	2.9	2.7	5.8	10.3	OD	3.2	1.7	4.4	5.1																
1087	E	2.7	1.8	3.5	4.6	18.11	OE	3.2	2.5	6.4	10.5	OE	1.8	1.1	2.1	1.9	OE	2.4	1.5	2.4	2.6	POS	OD	3.1	2	5	6.3	OD	3.4	1.7	3.7	3.5	OD	2.6	2.5	4.5	6.2
1128	E	7	7	1.4	1.1	24.11	OE	2.8	2.2	3.9	4.4	OE	2.6	2.3	4.1	7.4	OE	2.9	2.1	5.4	7.8	NEG	OD	3.4	2.6	5.6	8.8										
1082	D	0.6	0.9	0.6	0.3	24.11	OD	3.3	1.3	4.8	5.4	OD	2.9	1.9	3.8	5.1	OD	1.2	0.8	0.9	0.5	NEG	OE	3.6	2.7	7.7	14.1										
1137	D	1.3	0.8	1	0.3	24.11	OD	3.4	1.8	4.8	5.8	OD	2	1.9	3	3.8	OD	2	1.6	0.9	0.5	NEG	OE	2.8	2.3	5.5	8.6										
9079	E	2.6	2.4	4.7	6.3	24.11	OE	1.8	1.3	2.5	2.7																										
669	E	2.4	1.4	2.6	2.2	02.12	OE	1.5	1.1	1.7	1.1	OD	2.1	1.7	3.1	3.8	OD	2.7	1.3</																		

Tabela 25 (continuação)

1092	E	1.1	1.1	1.1	0.7	02.12	OE	3.1	2	6.2	10.5	OE	2.4	2.2	4.5	6.8	OE	1.9	2.4	3.5	4.4	POS	OE	2.4	1.9	3.5	4.2	OE	3	2.1	4.2	5.5	OE	3.3	1.8	4.6	5.3
633	D	1.3	0.9	1	0.6	02.12	OD	2.4	1.8	3.6	4.4																										
8802	D	1.5	1.6	2.5	2.8	09.12	OD	5.9	3.4	16.1	38.3	OD	2.7	2.4	4.9	6.6	OD	2.3	2.2	4.3	6.5																
9131						09.12	OE	3	1.5	3.7	3.7	OE	1.9	1.4	2	1.8																					
8734	D	1.6	1.1	1.4	1.1	09.12	OD	3.4	1.9	5.4	7	OD	2.9	1.9	4.5	5.9	OD	2.4	1.5	3.3	3.3																
8934	D	1.4	1.2	1.3	0.9	09.12	OD	3.2	2.2	5.6	7.9	OE	1.5	1.8	2.7	2.9																					
277	E	1.1	1	0.6	0.2	09.12	OE	2.6	1.8	4	5.3	OE	3.8	2.2	5.6	7.5	OE	1.8	1.8	2.5	2.6																
8920	D	1.4	1.2	1.9	1.5	09.12	OE	2.5	1.8	3.4	4.3	OE	2.7	1.6	3.4	3.5	OE	3.2	1.5	3.7	3.6	NEG															
307	D	1.6	1.1	1.5	1.2	09.12																															
1120	E	1.9	1.5	2.4	2.6	09.12	OE	3.5	1.9	5.9	7.9	OE	2.6	1.7	4	4.6	OE	2.3	1.8	3.6	4.3																
1141	E	1.9	1.5	2	1.7	09.12	OE	2.9	2	4.9	6.5	OE	1.5	2.3	2.6	2.6	OE	3	2.2	4.8	6.9	POS	OE	3	2.1	4.2	5.5										
1085	D	2	1.8	2.9	3.3	15.12	OD	3.6	1.9	5.7	7.7	OD	2.9	2.5	5.7	9	OD	2.2	1.7	3.7	4.4	POS	OD	3.5	2.2	5.8	8.6	OD	3.6	2	6.5	9.1	OD	3.4	1.9	5.3	6.6
1138	D	2.4	2.2	4.7	7.5	15.12	OD	3.2	2.2	5.2	6.8	OD	2.9	1.5	3.7	4	OD	3.1	1.8	4.6	5.7																
9008	D	1.2	1.2	1.3	1	15.12	OD	3.3	2.1	5.7	8.9	OD	2.6	2.2	3.6	4.2																					
657	E	1.6	1.5	2.1	2	15.12	OE	2.5	1.8	3.7	4.5	OE	3.1	1.5	4.3	4.8	OE	3.6	2.2	6.3	9.5	NEG	OD	2.9	1.8	4.3	5.7										
383	E	1.5	1.6	2.2	2.2	15.12	OE	2.6	1.9	4.5	6.6	OE	3	2.8	6.2	11.4	OE	4	2.7	8.7	15.8	POS	OE	2.6	2.1	4.5	6.3										
751	D	2	0.8	1.6	1.2	15.12	OD	3.4	2.3	6.9	10.7	OD	2.2	2.2	4.2	6.2	OD	2.7	1.8	4.6	6.2	??	OD	3.4	1.9	6.1	7.6										
778	E	3.2	3.1	7.7	15.3	23.12	OE	2.9	1.9	3.6	3.6	OE	2.9	2.3	5.2	7.6																					
222	D	1.8	1.2	1.5	1.2	23.12	OD	2.3	1.4	2.5	2.4																										
27	E	1.9	1.9	3.9	4.8	23.12	OE	2.9	1.7	4.4	5	OE	3.4	2.2	5.8	7.9	OE	2.6	2.2	4.7	7	POS	OE	2.6	2.4	4.7	7.3	OE	3	2.2	3.9	4.4	OE	2.8	2.8	5.1	7.8
1108	D	1.4	1.2	1.5	1.2	30.12	OD	2.9	2	4.2	5.3	OD	2.7	2.6	4.3	5.4	OD	2.1	2.1	3	3.1	NEG	OE	2.9	1.2	2.8	2.4										
8718	D	1.4	1.2	1.5	1.2	30.12	OD	2.9	2.1	4.3	6.1	OD	3.6	2.2	5.7	7.8	OD	2.4	2.4	4.2	5.2	POS	OD	3	2.2	4.7	6.6	OD	3.1	1.8	5.1	6.7	OD	3	2.1	4.6	6.4
231	E	1.3	1.2	1.3	1	30.12	OE	3.7	1.9	5.4	6.6	OE	2.4	2	3.4	4.3	OE	3.2	2.4	6	9.3	POS	OE	3.4	2.2	4.7	6.2	OE	2.9	1.7	4	4.9	OE	3	2.3	5.2	7.7
1057	D	1.6	1.5	1.3	1	30.12	OD	3.5	2.4	6.5	9.1	OD	2.9	2.3	5.7	8.5	OD	2.4	2.2	4.2	6	POS	OD	2.5	2	3.5	4	OD	3	2.1	4.6	6.2	OD	2.9	1.8	4.2	5.1
187	D	3.4	3.4	9.5	21.6	30.12	OD	5.5	2.8	11.9	21.9	OD	2.6	1.3	2.9	2.6	OD	2.6	2.2	4.6	6.4	POS	OE	2.7	1.9	4.8	6.3	OE	2.3	2	3.7	4.9	OE	3.5	2.1	6.5	9.7
423	D	1.6	1.3	1.6	1.2	30.12	OD	2.8	1.7	3.6	3.9																										
493	D	1.5	1.5	2	1.9	06.01.17	OD	4.3	2.7	9.4	17.8																										
290	D	4.6	3.5	14.4	34.6	06.01	OD	2	1	2.9	3.1	OD	3.1	2.4	5.4	7.8	OD	2.2	2.2	3.7	4.8																
9114	D	1.2	0.8	0.7	0.4	06.01	OD	3	1.9	5.1	6.5	OD	3.8	2.1	5.8	7.7																					
1169	E	1.3	1.1	0.9	0.5	06.01	OE	2.4	1.6	2.9	2.7	OE	2.8	1.8	4.9	6.5	OE	2.9	1.8	4.2	4.9	POS	OE	2.2	1.6	2.7	3	OE	2.5	1.6	3.3	3.6	OE	3.5	1.8	5.1	6
1008	D	1.8	1.6	2.7	3	06.01	OD	4.2	2.6	7.7	12.5	OD	3.2	2.9	7.9	15.2	OD	3.1	2.1	5.2	6.7	POS	OD	2.4	2.3	4.6	6.7	OD	2.7	2.3	5.2	7.3	OD	3.6	2.2	5.7	7.7
208	E	1.3	1.3	1.5	1.2	06.01	OE	2.8	1	3.9	4.4	OE	2.5	1.9	4.1	5.4	OE	2.6	1.7	4.2	5.4	POS	OE	2.5	1.9	4.3	5.6	OE	2.6	1.9	4.3	6	OD	3.4	2.2	5.5	7.8
1187	D	1.4	1.4	1.5	1.4	06.01	OD	2.9	1.6	4.2	5.1	OD	2.5	1.8	4.3	5.6	OD	2	1.8	3	3.7	POS	OD	3.4	1.7	5.5	6.9	OD	2.9	2.1	4.1	5.2	OD	2.9	2.5	5.6	8.7
1143	D	1.5	1.4	1.8	1.7	06.01	OD	1.9	2.7	4.3	5.8	OD	3.4	2	5.3	7.6	OD	2.8	2.5	4.9	7.3	NEG	OD	2.9	1.9	4.4	5.1										
8126	D	1.3	1.2	1.1	0.8	13.01	OD	4.8	3.7	10.7	19.3	OD	4	2.9	10.5	22.6	OD	3.1	2.4	5.8	8.9	POS	OD	3.1	2.4	5.8	8.9	OD	2.6	2.4	5.1	8.4	OD	3	2.6	6.3	10.8
1130	D	1.4	1.2	1.5	1.4	13.01	OD	2.2	1.6	3.1	3.7	OD	3.1	2	5.3	7.2	OD	2.3	1.7	3.5	3.6																
1180	D	2	1.6	2.5	2.3	13.01	OD	3.4	2.3	5.3	7.4	OD	4.4	2	7.5	10.4	OD	2.7	2.3	5.2	7.6	POS	OD	3.3	2.3	6.3	10.2	OD	2.7	2.3	5.2	8.1	OD	3.2	2.2	5.2	7.1
1190	E	1.9	1.2	1.8	1.5	13.01						OE	3.4	2.3	6.3	9.8	OE	3.3	2.6	7	12.3	NEG															
1190	E	2.1	1.4	1.8	1.5	13.01	OE	3.4	2.9	7.3	13.7	OE	3.1	3	8.2	15.9	OE	3	2.2	6.4	10.4	POS	OE	2.7	2.6	5.5	8.9	OE	3.1	2.2	5.3	7.5	OE	3.9	1.5	5.4	6.5
369	E	0.8	0.6	0.4	0.2	13.01	OE	2.3	1.5	3.2	3.3																										
9193	D	1.7	1.4	1.5	1.3	13.01	OD	4.3	1.6	4.2	4.3	OD	2.5	1.7	4	4.3	OD	2.2	1.7	3.4	4.3	NEG	OD	3	1.3	3.5	3.4										
8736	D	3	2	4.7	6.9	20.01	OE	2.4	1.4	2.5	2.3	OE	3.1	2.4	5.6	9	OE	1.8	1.6	2.2	2.3	POS	OE	2.5	2.2	4.2	5.8										
730	D	2	1.4	2.6	2.7	20.01	OD	2.5	1.6	3.1	3.2	OD	1.3	0.8	1.3	0.8	OD	2.1	0.9	1.8	1.1																
309	E	2.2	1.8	2.7	3.1	20.01	OD	1.7	1.6	2.2	2.3	OD	2.9	1.9	4.4	5.4	OD	3.1	1.9	5.1	6.3	POS	OD	3	1.6	3.6	3.7	OD	4.1	2.4	7	10.8	OD	3.1	2.4	6.2	9.3
215	E	1.8	1.7	2.3	2.5	20.01	OE	2.4	1.3	1.8	1.1	OE	3.2	1.5	3.8	3.6	OE	2.4	1.2	2.4	2	NEG	OD	2.7	2.1	5	7										
377	D	1.7	1	1.1	0.6	20.01	OD	2.9	2.1	5.7	8.6	??																									
1135	D	1.2	1.1	1	0.6	20.01	OD	2.2	1.9	3.4	4	OD	2.7	1.8	4.2	5	OD	2.6	1.8	3	3.2																
1123	E	1.7	1.4	2	1.8	20.01	OE	2.3	1.9	3.6	4.8	OE	3.6	2.3	6.3	10	OE	2.7	2.3	5.1	7.3	NEG	OD	3.5	2.4	6.6	9.9										
1025	E	1.5	1.2	1.3	1.1	20.01	OE	3.1	2.1	4.9	6.8	OE	3.3	1.9	5.4	7	OE	2.2	1.8	3	3.5																
964	E	2.2	1.7	2.6	2.9	20.01	OE	2.5	1.8	3.7	4.6	OE	3	2.3	5.7	9.2	OE	2	1.6	2.8	3.1	POS	OE	2.2	2	3.4	3.8	OE	2.1	1.5	2.4	2.3	OE	3.7	2.2	5.4	6.8
418	D	1																																			



Tabela 26 – Tabela após o tratamento de dados

78

Tabela 27 (continuação)

669	M	2	92	D	OD	1.9	1.2	1.791	Superstar	OD	1.8	2.5	3.534	OD	2.1	1.7	2.804	-0.730	OD	2.7	1.3	-0.047	2.757	G	OD	1.9	1.5	2.238	-0.518	G	OD	2.8	1.6	3.519	1.380	G	OD	2.8	1.8	3.958	0.440
669	NA	NA	NA	NA	OE	1.5	1.1	1.296	OE	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	OE	3.2	1.3	NA	3.267	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
8734	M	5	72	D	OD	1.6	1.1	1.382	Butler	OD	3.4	1.9	5.074	OD	2.9	1.9	4.328	-0.746	OD	2.4	1.5	-1.500	2.827	NG	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
8734	NA	NA	NA	NA	OE	1.6	1.1	1.382	NA	OE	2.7	1.9	4.029	OE	2.7	2.2	4.665	0.036	OE	3	1.4	-1.367	3.299	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
277	M	3	72	D	OE	1.1	1	0.864	Fernando	OE	2.6	1.8	3.676	OE	3.8	2.2	6.566	2.890	OE	1.8	1.8	-0.021	2.545	NG	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
277	NA	NA	NA	NA	OD	1.1	1.1	0.95	NA	OD	3.2	3.4	8.545	OD	2.9	1.5	3.426	-5.129	OD	1.8	1.7	-0.013	2.403	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
751	M	2	72	D	OD	2	0.8	3.257	Butler	OD	3.4	2.3	6.242	OD	2.2	2.2	3.801	-2.940	OD	2.7	1.8	0.016	3.817	NG	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
751	NA	NA	NA	NA	OE	2.4	2.1	3.958	NA	OE	2.7	2.6	5.513	OE	2	1.6	-0.000	2.513	OE	2	1.6	-0.000	2.513	G	OD	3	2.2	5.184	0.660	G	OD	3.1	1.8	4.383	-0.802	G	OD	3	2.1	4.948	0.565
8718	M	6	76	D	OD	1.4	1.2	3.319	Colgate	OD	1.9	2.1	4.283	OD	3.6	2.1	6.220	1.437	OD	3.4	2.4	-1.096	4.524	G	OD	3	2.2	5.184	0.660	G	OD	3.1	1.8	4.383	-0.802	G	OD	3	2.1	4.948	0.565
8718	NA	NA	NA	NA	OE	1.2	0.8	0.754	NA	OE	3.8	2	5.488	OE	3.8	1.4	3.679	-2.419	OE	3.9	2.7	1.343	2.422	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
27	M	4	74	D	OE	1.9	1.9	2.835	Pyrethroid	OE	2.9	1.7	3.872	OE	3.4	2.2	5.875	2.031	OE	2.6	2.2	-1.882	4.492	G	OE	2.6	2.4	4.901	0.408	G	OE	3	2.2	5.184	0.283	G	OE	2.8	2.8	6.158	0.974
27	NA	NA	NA	NA	OD	1.4	1.4	1.539	NA	OD	2.6	1.8	5.089	OD	4.2	2	6.597	1.508	OD	2.7	2	-2.356	4.241	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
208	M	3	72	D	OD	1.4	1.1	1.21	Butler	OD	2.2	1.5	2.902	OD	2.4	2.7	5.089	2.408	OD	2.2	1.8	-1.979	3.110	G	OD	3	2.2	5.184	2.073	G	OD	3	2	4.712	-0.471	G	OD	3.4	2.2	5.875	1.162
208	NA	NA	NA	NA	OE	1.3	1.3	1.127	NA	OE	2.8	1	2.199	OE	2.5	1.9	3.781	1.512	OE	2.6	1.7	-0.259	3.471	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
9185	M	4	72	D	OD	1.7	1.4	1.869	Pyrethroid	OD	4.3	1.6	5.404	OD	2.5	1.7	3.338	-2.056	OD	2.2	1.7	-0.401	2.937	NG	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
9185	NA	NA	NA	NA	OE	2.1	1.9	3.134	NA	OE	4.2	3	9.895	OE	4	3	9.895	6.762	OE	4	3	-0.471	9.425	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
964	P	1	72	D	OE	2.2	1.7	2.937	Butler	OE	3	1.8	3.534	OE	3	2.3	5.419	1.885	OE	2	1.6	-2.906	2.513	G	OE	2.2	2	3.456	0.942	G	OE	2.1	1.5	2.474	-0.982	G	OE	3.7	2.2	6.393	3.919
964	NA	NA	NA	NA	OD	1.8	1.6	2.262	NA	OD	1.8	1.6	2.262	OD	2.8	1.8	3.958	1.096	OD	2.2	1.7	-1.021	2.937	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	



### Anexo 3

Figura 16 – Imagem ecográfica de um folículo e corpo lúteo



Figura 15 – Imagem ecográfica do corpo lúteo cavitário

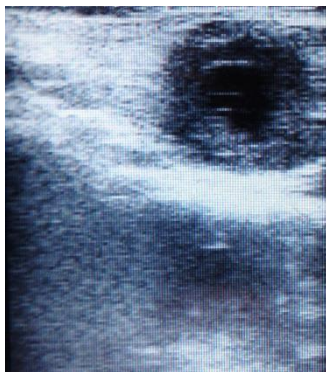


Figura 14 – Imagem ecográfica do corpo lúteo



Figura 17 – Imagem ecográfica de um embrião com 35 dias



Figura 18 – Imagem ecográfica de um feto com 42 dias

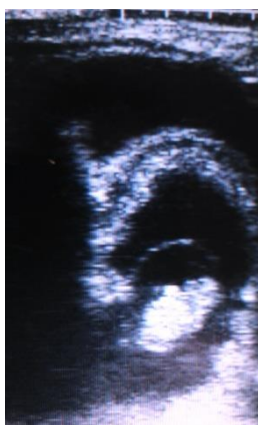


Figura 19 – Imagem ecográfica de um feto com 63 dias

